UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1965 — Série U – No. 410

THÈSE

présentée

À LA FACULTÉ DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

par

ROBERT GOYER

né le 13 mai 1938 à Montréal (Canada)

■

soutenue le 5 mars 1965

■

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE DIX DÉRIVÉS SOUFRÉS DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE TRISUBSTITUÉ

■

JURY: MM. G. Valette, président
J. A. Gauthier
P. Rossignol } Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534911_0118

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1965 — Série U – No. 410

THÈSE

présentée

À LA FACULTÉ DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

ROBERT GOYER

né le 13 mai 1938 à Montréal (Canada)

■

soutenue le 5 mars 1965

■

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DE DIX DÉRIVÉS SOUFRÉS DE L'ACIDE ORTHOPHOSPHORIQUE TRISUBSTITUÉ

■

JURY: MM. G. Valette, président

J. A. Gauthier, P. Rossignol { Examinateurs

PERSONNEL
DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE PARIS

ADMINISTRATION:

M. G. VALETTE	Doyen,
M. MM. JANOT	Assesseur,
M. P. MALANGEAU	Assesseur,
M. L. RODINEAU	Secrétaire Général,
Mme S. FERRARI	Attachée Principale,
Mme M. L. ESPINASSE	Attachée,
M. L. JEANDEL	Attaché,
Mme C. PEILLON	Attachée,
M. A. BRENN	Attaché,
Mlle G. BIDEAU	Secrétaire,
Mme S. CERTAIN	Secrétaire,
Mme M. COUSIN	Secrétaire,
M. A. DROUILLY	Secrétaire
Mme L. WARNESSON	Secrétaire,

DOYEN HONORAIRE:

M. R. FABRE — Membre de l'Institut,

PROFESSEURS HONORAIRES:

M. M. DELEPINE	Membre de l'Institut,
M. L. LAUNOY	
M. P. FLEURY	
M. M. PIGON	
M. C. BEDEL	
M. R. FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS:

M. M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T)
M. G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
M. R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
M. M. GUILLOT	Physique (T)
M. J.A. GAUTIER	Chimie organique (T)
Mlle S. LAMBIN	Microbiologie (T)
M. Y. RAOUL	Physiologie (T)
M. J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
M. L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
M. P. CRETE	Botanique (T)
M. R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle

M. A. MORETTE	Hydrologie (T)
M. R. CAVIER	Parasitologie (T)
M. A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education Sanitaire (T)
M. R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
M. A. GERMAN	Virologie et Sérologie (T)
M. M. PIETTE	Biologie sanguine (T)
M. P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
M. M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
M. G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. G. DEYSSON	Cytologie végétale (T)
M. J. FLAHAUT	Minéralogie (T)
M. C. BOUDENE	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M. J. RENAULT	Chimie organique (T)
M. A. LE HIR	Pharmacie galénique
M. P. LARUELLE	Physique
M. P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
M. A. MANGEOT	Pharmacie galénique industrielle
M. P. DELAVEAU	Matière médicale
M. Y. COHEN	Sciences naturelles
M. H. RENAULT	Physique

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

M. R. BOURDON	Chimie analytique
M. G. LE MOAN	Sciences appliquées
M. C. PAOLETTI	Sciences appliquées
M. P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
M. J. POISSON	Sciences naturelles
M. A. DESVIGNES	Cryptogamie et technique bactériologique
M. F. PERCHERON	Sciences appliquées
M. J. SAVEL	Biologie animale
M. J. BORY	Sciences naturelles
M. M. MIOCQUE	Chimie organique
M. J.L. GUIGNARD	Botanique générale
M. J.C. GOUNELLE	Sciences naturelles
M. P. BINET	Biologie animale et Zoologie
M. C. COMBET-FARNOUX	Chimie organique
Mme M. PLAT	Sciences appliquées
M. E. DELACOUX	Sciences physico-chimiques
M. J. DIDRY	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme J. BLANC	Chimie analyses (1ère année N.)
M. A. CARLIER	C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle
M. J. CHARLES	Mathématiques

M. C. DAGRON	Chimie préparations (1ère année N.)
Mlle M.T. DECAUDIN	Biologie animale (3ème année)
M. C. DREUX	C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse
Mlle G. DUMANT	Chimie préparations (1ère année N.)
M. P. GEORGES	C.E.S. Parasitologie
M. P. GESTEAU	C.E.S. Biochimie
Mlle M.J. GOURSAT	Chaire de botanique
M. H. GUERIN	Biologie végétale (3ème année)
M. M. GUERNET	Chimie (2ème et 3ème années)
M. M. HAMON	Chimie analyses (1ère année N.)
M. J. HARISPE	Chimie préparations (1ère année)
M. G. HAZERBROUCQ	Physique
M. J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme J. HUBERT	C.E.S. Bactériologie
Mme M.J. HURON	Mathématiques
Mlle Y. JUND	C.E.S. Microbiologie
M. M. LEBOEUF	C.E.S. Pharmacotechnie
Mme N. LEGER	Zoologie
M. R. LEDUC	Microbiologie (4ème année)
M. A. LEMONNIER	Chimie analyses (2ème et 3ème années)
Mme S. LEMONTEY	Chimie (4ème année)
Mlle M. LONGEVIALLE	Chaire de botanique
Mlle S. LONGUEVIALLE	Chimie examens
M. J. MANDEREAU	C.E.S. Pharmacotechnie
M. H. MARTIN FRERE	Chimie préparations (1ère année N.)
Mlle H. MORIN	C.E.S. Pharmacodynamie
M. H. MOSKOWITZ	Chimie analyses (1ère année N.)
Mme M.J. NOTTEGHEN	Zoologie
M. NGUYEN PHU LICH	C.E.S. Toxicologie
M.M. PARIS	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie)
M. R. PERLES	C.E.S. Biochimie
M. J. PESTIS	Biologie animale (2ème année)
M. P. POULLAIN	C.E.S. Hématologie
M. J. RIVET	Chaire de Physique
Mme M. ROBERT	C.E.S. Sérologie
Mlle A. ROLLEN	Biologie végétale (2ème année)
Mlle L. SEGUIN	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Physico-Chimie)
Mme M. SEILLER	Pharmacie galénique industrielle
M. J. YONGER	Chimie analyses (1ère année)

BIBLIOTHÈQUE

Mlle Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Mlle S. LAVAUD	Conservateur
Mme G. KREHMER	Conservateur
Mme A. DESGRIPPES	Bibliothécaire

À MA FEMME

À MON FILS

À MES PARENTS

À MES BEAUX-PARENTS

À MON FRÈRE

À MES SOEURS

À TOUS LES MIENS

En témoignage de ma profonde affection

À TOUS MES AMIS

À MON MAÎTRE

Monsieur le Professeur J. CHEYMOL

Directeur de l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris,
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine de Paris,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Pharmacien-chef de l'Hôtel-Dieu
Officier de la Légion d'honneur

Qui nous a accueilli dans son laboratoire, nous a confié le sujet de cette thèse et nous a dirigé pendant toute la durée de ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur G. VALETTE
Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Pharmacien-chef de l'Hôpital Cochin
Officier de la Légion d'honneur

Qui nous a toujours accueilli avec bienveillance à la Faculté de Pharmacie de Paris et nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien accepter l'expression de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.A. GAUTHIER
Professeur de Chimie organique à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui a bien voulu faire partie du jury de notre thèse.

Très respectueux hommage.

A Monsieur le Professeur P. ROSSIGNOL
Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie de Paris

Qui a si aimablement accepté de juger notre travail.
Témoignage de sincères remerciements.

A Mademoiselle M. BEAUVALLET
Directeur scientifique au Centre National de la Recherche Scientifique

En témoignage de notre vive gratitude.

A Monsieur P. CHABRIER
Directeur scientifique au Centre National de la Recherche Scientifique

Hommage respectueux.

A Monsieur F. BOURILLET

Assistant à l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris

En témoignage de notre reconnaissance.

A Monsieur R. LAROSE

Gouverneur de l'Université de Montréal

En témoignage de notre considération et de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur A. ARCHAMBAULT

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal

En témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

Nous remercions bien sincèrement tous les chercheurs de l'INSTITUT DE PHARMACOLOGIE qui, par leur sympathie et leurs conseils, nous ont grandement facilité ce travail.

ABRÉVIATIONS

ACh	: acétylcholine
AChE	: acétylcholinestérase
antiChE	: anticholinestérasique
ATP	: acide adénosine triphosphorique
BuCh	: butyrylcholine
BuChE	: butyrylcholinestérase
ChAc	: choline-acétylase
ChE	: cholinestérase
DFP	: diisopropylfluorophosphate
DL 50	: dose létale 50 p. 100
D.M.L.	: dose minimale létale
D.Min.P.Max.	: dose minimale potentialisatrice maximale (des contractions musculaires)
d–TC	: chlorure de *d*–tubocurarine
Nu 683	: bromure de (phényl–5 N–diméthyl carbamoyloxy–2) benzyl triméthylammonium
OMPA	: octaméthylpyrophosphoramide
P.–O.	: diéthylparanitrophénylphosphate
ppm	: potentiel de plaque motrice
pseudoChE	: pseudocholinestérase
S.N.A.	: système nerveux autonome
S.N.C.	: système nerveux central
TEPP	: tétraéthylpyrophosphate
284.C.51	: dibromométhylate de di (p. N–allyl N–méthyl aminophényl)–1,5 pentanone–3
*	: nom déposé

PLAN

INTRODUCTION

GÉNÉRALITÉS

Chapitre I: Historique

Chapitre II: Mécanismes cholinergiques et anticholinergiques

A.– L'acétylcholine

B.– Les cholinestérases

C.– Les anticholinestérasiques

D.– Réactivation des cholinestérases

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHIMIE

PHARMACOLOGIE

Première Partie:

Détermination du pouvoir anticholinestérasique

Deuxième Partie:

Essais de toxicité

Troisième Partie:

Préparation neuromusculaire

Chapitre I: Notions générales sur la transmission neuromusculaire et sur l'action des anticholinestérasiques au niveau de la jonction myoneurale.

Chapitre II: Méthodes expérimentales.

Chapitre III: Résultats expérimentaux.

Quatrième Partie:

Système nerveux autonome

Chapitre I: Action des anticholinestérasiques sur les glandes salivaires.

Chapitre II: Action sur le système cardiovasculaire.

Chapitre III: Action sur les muscles lisses.

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

Les recherches entreprises dans le domaine de la Chimie et de la Pharmacologie des esters organophosphorés ont pris, depuis 1930, une ampleur considérable. Cependant, malgré les trois principales orientations (gaz de combat, insecticides, agents thérapeutiques) qu'a prises ce développement, elles reposent, toutes trois, sur la propriété de ces composés d'être des inhibiteurs puissants et difficilement réversibles des cholinestérases.

Depuis plusieurs années, l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris s'est intéressé particulièrement à ce groupe de composés. Dans un mémoire présenté lors d'une séance des Actualités Pharmacologiques, P. CHABRIER [1963] a exposé les nombreux travaux réalisés dans ce laboratoire; on y trouve également une bibliographie importante des thèses et publications parues à ce sujet. Parmi celles-ci et d'autres plus récentes, citons en particulier les articles de CHABRIER et coll. [1957], G. CHEYMOL [1962], J. CHEYMOL [1962], J. CHEYMOL et coll. (1958, 1959, 1960a, 1960b, 1961, 1963a, 1963b, 1964a, 1964b, 1964c], CHOISY [1962], DEYSSON et coll. [1964] et OLIVE [1963]. Notre travail s'insère donc dans le cadre des recherches entreprises dans cet Institut, recherches auxquelles nous sommes heureux d'apporter une modeste contribution.

Le sujet qui nous a été proposé concerne les "Rapports entre la structure chimique et les activités pharmacodynamiques de dix dérivés soufrés de l'acide orthophosphorique trisubstitué". Nous avons tenté de dégager l'influence des formes "thiono" (1) et "thiolo" (1) sur l'activité de ces molécules. L'action de ces produits au niveau de la jonction neuromusculaire a surtout retenu notre attention, mais nous nous sommes efforcé d'étendre le plus possible le champ de nos recherches en utilisant les principales techniques de la pharmacodynamie classique.

Sur les conseils de notre Maitre le Professeur J. CHEYMOL, nous avons séparé, à l'intérieur de chaque chapitre, la partie expérimentale de l'interprétation des résultats, car si des expériences bien faites conservent toujours leur valeur, l'interprétation des résultats, faite selon les théories les plus nouvelles, est toujours sujette à une revision.

Remarque: Nos principales sources bibliographiques proviennent de l'article de HOLMSTEDT [1959] et surtout de l'ouvrage de KOELLE [1963] qui constitue, en ce domaine, un document de base.

(1) Voir formules page 25

I — GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE I

HISTORIQUE

Philippe de CLERMONT, travaillant au laboratoire de WURTZ, professeur de Chimie et de Pharmacie à la Faculté de Médecine de Paris, étudie, dès 1854, un composé que MOSCHNINE vient d'y synthétiser: le tétraéthylpyrophosphate (TEPP). Ses recherches se limitent cependant aux propriétés chimiques et physiques.

En 1873, en Allemagne, von HOFFMANN prépare le dichlorure de méthylphosphoryle, premier exemple d'une liaison entre les atomes de carbone et de phosphore.

Vers la fin du XIXe siècle, à l'Université de Rostock, MICHAELIS et ses élèves (SCHALL en particulier) préparent des substances à liaison azote-phosphore et cyanure-phosphore, dont le cyanure de diéthylamidoéthoxyphosphoryle, précurseur du Tabun (monoéthyldiméthylaminocyanophosphate) et de nombreux insecticides actuels.

Le véritable essor des organophosphorés ne débute cependant que vers 1930. C'est en effet à cette date qu'en Suède NYLEN réussit la préparation du TEPP par deux procédés différents et l'obtient à l'état pur. Il synthétise aussi plusieurs autres composés phosphorés, mais il n'en apprendra leur puissante toxicité que 18 ans plus tard.

En Russie, ARBUZOW et coll. [1931] réussissent la synthèse de quelques dérivés tétrasubstitués de l'acide hypophosphorique.

En 1932, LANGE et von KRUEGER, dans l'espoir de découvrir de nouveaux insecticides organiques, synthétisent des molécules à liaison fluor-phosphore. Lors de la préparation du diméthyl– et du diéthylfluorophosphate, ils ressentent les effets toxiques de leurs vapeurs. Malgré leur désir d'en faire évaluer l'activité, personne ne s'intéresse à cette étude.

Toujours dans la même ligne de recherches et à la même époque, SCHRADER commence un long et fructueux travail sur

les dérivés organiques du phosphore. De 1936 à 1944, il synthétise plus de 200 composés dont les plus connus sont:

- le Tabun et le Sarin (monoisopropylméthylfluorophosphate): dont on envisage l'utilisation comme gaz de combat.
- Le DFP (diisopropylfluorophosphate) et le Para–oxon (diéthylparanitrophénylphosphate): utilisés en thérapeutique (myasthénie grave et glaucome).
- le Parathion (diéthylparanitrophénylthiophosphate) et l'OMPA (octaméthylpyrophosphoramide): à propriétés insecticides.

Après la publication de SCHRADER sur le Parathion, la classe des organophosphorés soufrés est l'objet d'une attention particulière; il semble en effet que ce groupe de composés puisse offrir des espérances valables quant à la mise au point de substances à action insecticide très prononcée, mais à toxicité relativement faible pour les mammifères. Ainsi, le Malathion (diméthyl S-[1,2- dicarbéthoxyéthyl] dithiophosphate) constitue une des premières grandes réussites dans ce domaine.

Les premiers travaux pharmacologiques, retrouvés dans la littérature, datent de 1937. Ils furent effectués respectivement en Allemagne et en Angleterre, mais en raison de l'intérêt qu'ils présentaient pour la Défense Nationale, les résultats importants de ces recherches ne furent divulgués qu'à partir de 1945. Parmi les nombreux chercheurs qui, dès cette période, s'intéressèrent aux organophosphorés, citons:

- –GREMELS, qui démontre les propriétés anticholinestérasiques (antiChE) du Tabun.
- –GROSS, qui met en évidence l'action inhibitrice du TEPP sur la cholinestérase (ChE).
- –KOLL, LENDLE, SEXTEL, WIRTH, ADRIAN et DUBOIS . . .

Les toxicités sont également déterminées d'une part sur des animaux de laboratoire et, d'autre part, sur des volontaires recevant de faibles doses de produits.

L'intérêt pour les organophosphorés s'accroît de plus en plus à partir de 1950. CASSADAY étudie le Malathion, SCHRADER et LORENZ introduisent le Systox (diéthyl 2–éthylthioéthyl thiophosphate), GHOSH et NEWMAN, en 1955, démontrent l'action très puissante des esters phosphorés soufrés et, en 1958, TAMMELIN introduit une nouvelle série de composés associés aux esters de la choline et de la thiocholine. En Russie, principalement sous la direction de RASUMOV [1957a, 1957b] et de MIKHELSON [1957], de nombreux travaux sur les organophosphorés sont également en cours. A l'heure actuelle, on évalue à une centaine le nombre de produits nouveaux synthétisés chaque année.

CHAPITRE II

MÉCANISMES CHOLINERGIQUES ET ANTICHOLINERGIQUES

Introduction

A – L'ACÉTYLCHOLINE
1) Historique, rôle et constitution.
2) Rôle de la choline-acétylase dans la synthèse de l'acétylcholine.
3) Bio-synthèse de l'acétylcholine.
4) Sort de l'acétylcholine.

B – LES CHOLINESTÉRASES
1) Classification.
2) Centres actifs de cholinestérases.
3) Destruction de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase.

C – LES ANTICHOLINESTÉRASIQUES
1) Classification.
2) Cinétique de l'interaction entre acétylcholinestérase et anticholinestérasique.
3) Métabolisme:
   a) absorption.
   b) distribution.
   c) excrétion.
   d) transformations métaboliques:
      – réactions d'activation métabolique:
         i) Organophosphorés à action anticholinestérasique *in vitro* et *in vivo*.
         ii) Organophosphorés à action anticholinestérasique *in vivo*.
            * oxydation des phosphorothionates.
            * oxydation des thio-étherphosphorothionates.
            * oxydation des phosphoramides.
      – réactions de détoxication
         i) hydrolyse par des enzymes tissulaires.
         ii) hydrolyse par des estérases.

D – RÉACTIVATION DES CHOLINESTÉRASES BLOQUÉES PAR LES ORGANOPHOSPHORÉS.

Les esters organophosphorés, comme nous l'avons dit précédemment, sont de puissants inhibiteurs des cholinestérases (ChE). Il nous a donc semblé utile de rappeler brièvement le métabolisme et le rôle biologique de l'acétylcholine (ACh), nous arrêtant plus particulièrement sur les enzymes responsables de son hydrolyse, les cholinestérases. Dans un second temps, nous étudierons plus longuement les inhibiteurs de ces enzymes, les anticholinestérasiques (antiChE).

A – L'ACÉTYLCHOLINE

1) Historique, Rôle et Constitution.

En 1921, LOEWI mit en évidence le rôle de l'ACh comme médiateur chimique entre l'influx nerveux et les effecteurs viscéraux; il émit l'hypothèse de la fonction médiatrice de l'ester aux synapses ganglionnaires et aux jonctions neuromusculaires. Depuis, de nombreuses découvertes ont été faites et nous pouvons maintenant attribuer à l'ACh le rôle de médiateur chimique à plusieurs niveaux. C'est ainsi qu'elle agit (CHEYMOL [1962]):

a) en différents points du système nerveux automome:
   - au niveau des ganglions synaptiques des systèmes para- et orthosympathiques.
   - au niveau des terminaisons post-synaptiques parasympathiques.
   - selon certaines théories, au niveau des terminaisons post-synaptiques de l'orthosympathique, s'intercallant entre l'influx nerveux et la libération d'adrénaline et de nor-adrénaline .

b) sur certaines synapses du système nerveux central.

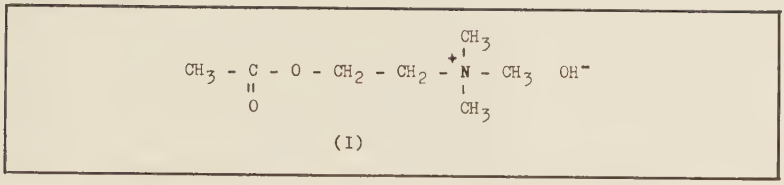
c) au niveau des plaques motrices.

d) aux terminaisons nerveuses dans la neurohypophyse.

Malgré son rôle exceptionnel, l'ACh (I) présente une constitution chimique très simple. Elle résulte de l'estérification de la fonction alcool de la choline par l'acide acétique et comporte ainsi deux groupements importants: une fonction ester acétique et un groupement ammonium quaternaire.

2) Rôle de la choline-acétylase dans la synthèse de l'ACh.

En 1943, NACHMANSOHN et MACHADO [1943] mettent en évidence l'existence d'une enzyme nécessaire à la formation de l'ACh: la choline-acétylase (ChAc), responsable du transfert du radical acétyle de l'acétyl-coenzyme A à la choline (KOREY et coll. [1951]). Dès 1948, FELDBERG et VOGT [1948] émettent l'hypothèse que la ChAc, produite au niveau du corps cellulaire, chemine au sein de l'axoplasme et atteint les terminaisons nerveu-



(I)

ses, où elle préside à la bio-synthèse de l'ACh. Ceci fut vérifié par de très belles expériences réalisées par HEBB et WAITES [1956].

3) Bio-synthèse de l'acétylcholine.

La série de réactions conduisant à la formation de l'ACh est maintenant établie de façon à peu près certaine et nous en avons schématisé les principales étapes dans la figure 1.

4) Sort de l'acétylcholine.

L'ACh, synthétisée dans les vésicules synaptiques, y est stockée sous forme dissoute. Toutefois, selon certains auteurs (FELDBERG [1950]), une partie serait sous forme liée, c'est-à-dire fixée à certains constituants (probablement lipidiques) de la matrice vésiculaire.

Le stimulus nécessaire à la libération d'ACh est l'influx nerveux. Ce dernier provoque une modification de la perméabilité de la membrane vésiculaire, permettant alors à l'ACh de diffuser et d'agir au niveau des récepteurs. On doit se garder de considérer l'ACh comme le seul médiateur chimique possible; des tra-

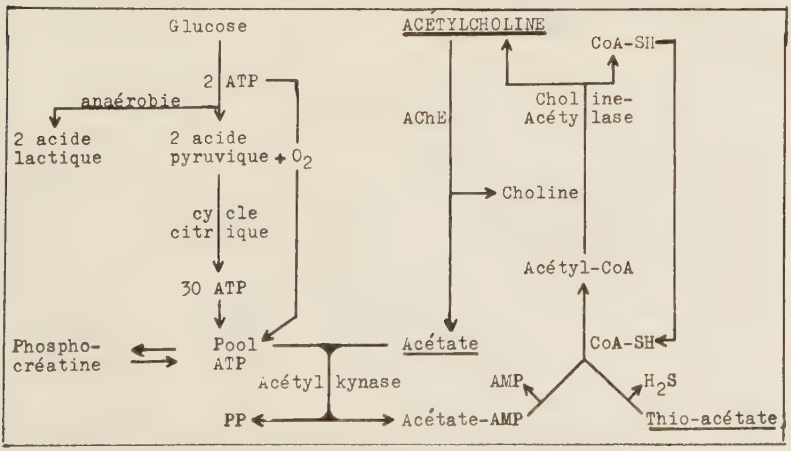


Figure 1.

Série de réactions conduisant à la formation d'acétylcholine

(NACHMANSOHN et coll. [1952])

vaux de GARDINER et WHITTAKER [1954], BERRY et WHITTAKER [1959] ont en effet montré que le tissu nerveux était capable de synthétiser *in vitro* des homologues de l'ACh. Dans certains cas, la transmission pourrait également se faire par la butyryl- ou propionylcholine. Il est donc indispensable que l'organisme dispose de moyens appropriés pour inactiver rapidement ce ou ces médiateurs, leur fonction physiologique une fois accomplie. C'est à ce stade qu'interviennent les cholinestérases.

B – LES CHOLINESTÉRASES.

"Découverte dans le coeur de Grenouille par LOEWI et NAVRATIL en 1926, par PLATTNER dans le sérum sanguin des mammifères, cette enzyme fut baptisée cholinestérase par STEDMAN en 1930. Il n'y a pas une cholinestérase, mais des cholinestérases, différenciées selon les substrats sur lesquels elles peuvent agir, les tissus qui les fournissent, les substances susceptibles de les inhiber" (J. CHEYMOL [1962]).

Ce sont des enzymes de nature protéique (holoprotéines); elles hydrolysent les esters de la choline à une vitesse plus grande que tous les autres esters, lorsque les vitesses d'hydrolyse sont comparées dans des conditions optimales d'activité (concentration du substrat, *p*H, concentration ionique du milieu).

1) Classification.

Il existe deux groupes de ChE: les acétylcholinestérases (AChE) ou ChE vraies ou spécifiques et les pseudocholinestérases(pseudoChE) ou ChE non spécifiques. Chaque groupe possède ses caractéristiques propres, réunies dans le Tableau I.

2) Centres actifs des cholinestérases.

Les ChE possèdent deux centres actifs (Figure 2):

– le premier présente une charge négative: c'est le site anionique. Son existence confère à ces enzymes leur caractéristique structurale et détermine leur spécificité d'action. C'est de lui que dépendent l'hydrolyse des esters de la choline et l'action inhibitrice des composés cationiques.

– le second, chargé positivement, attaque la fonction ester d'où son nom: site estérasique. Il détermine la spécificité du substrat, principalement en ce qui concerne le radical acide de l'ester.

L'AChE, à l'état pur, est un polymère contenant environ une centaine de sites actifs négatifs et positifs. Une seule molécule peut hydrolyser en une seconde plusieurs centaines de millier de molécules d'ACh. C'est l'enzyme dont la vitesse de

	Pseudocholinestérases	Acétylcholinestérases
Noms	benzoylcholinestérase butyrylcholinestérase propionylcholinestérase	acétylcholinestérase
Elles hydrolysent	à une vitesse décroissante, dans l'ordre suivant,	
	↓ la butyrylcholine la propionylcholine ↓ l'acétylcholine	l'acétylcholine la propionylcholine la butyrylcholine ↓
	certains esters non choliniques (butyrate de méthyle)	
	faiblement l'acétyl-β-méthylcholine	facilement l'acétyl-β-méthylcholine
	la benzoylcholine	
Inhibition spécifique par	certains dérivés de la phénothiazine certains organophosphorés (Nu 683)	les ammoniums quaternaires certains organophosphorés (OMPA)(284C51) la choline libérée par de fortes conc. d'ACh.
Inhibition non spécifique par	l'ésérine, les carbamates, les organophosphorés.	
Localisation	glandes salivaires, estomac, poumons, plasma, peau, coeur, pancréas, foie, muqueuses intestinales, substance blanche (SNC).	glandes salivaires, estomac, poumons, glandes surrénales, ganglions sympathiques, plaque motrice, substance grise (SNC), érythrocytes.

Tableau I: *Caractéristiques des cholinestérases* (Holmstedt [1959], Levy [1957], Ord et Thompson [1950].

Note: pour la formule chimique des Nu 683 et 284C51, voir à Abréviations.

réaction est la plus rapide que l'on connaisse. Dans l'organisme, son excès et son activité sont tels qu'un blocage (par un antiChE par exemple) de moins de 80% ne fait apparaître que très rarement de graves signes d'intoxication.

L'AChE existe dans toute cellule animale capable d'engendrer des courants bio-électriques et des influx conducteurs. Elle est localisée au niveau de la membrane conductrice des fibres nerveuses et musculaires, et la plus grande concentration d'enzyme se trouve dans les régions synaptiques et myoneurales.

3) Destruction de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase.

En tant qu'enzymes, les AChE sont des catalyseurs fa-

vorisant l'hydrolyse de l'ACh en acide acétique et en choline d'après le schéma proposé par NACHMANSOHN et WILSON [1954] (voir Figure 2).

Les réactions 1 et 2 (Figure 2) sont assez lentes, si on les compare avec les réactions 3 et 4, responsables de l'hydrolyse de l'enzyme acétylée. Cette facilité des réactions tient à une interaction électrique entre l'ACh et l'AChE, se situant en deux points différents du substrat et de l'enzyme: (voir Figure 2)

a) le site anionique, constitué d'une ou de plusieurs fonctions carboxyliques libres, attire, par les forces de Van der Waals (liaison faible), la fonction ammonium quaternaire (positive) de l'ACh.

b) le site estérasique ou cationique établit,

–par un groupement basique (G^+), une liaison avec le carbone du carboxyle de l'ACh.

–par un groupement acide (H), une liaison avec un des atomes d'oxygène.

Ces liaisons sont covalentes, donc beaucoup plus fortes que les

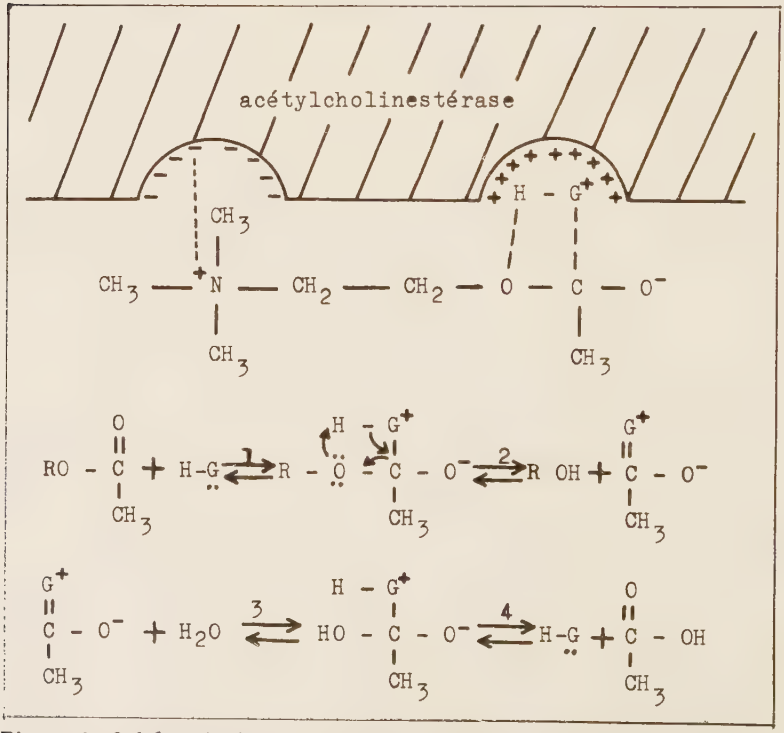


Figure 2: *Schéma de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase d'après* NACHMANSOHN et WILSON [1954].

premières. Ce dernier site devrait son activité à un groupement imidazole (MOUNTER et coll. [1957]) et surtout à un reste sérine, dont l'agencement des acides aminés qui l'environnent serait responsable de la spécificité propre de l'enzyme (COHEN et coll. [1959]).

L'hydrolyse proprement dite se fait en deux étapes successives:

i) après une modification dans la position des électrons autour de l'atome d'oxygène de la fonction alcool, il y a coupure entre H et G et l'enzyme cède un atome d'hydrogène. La choline ainsi formée, n'étant unie à l'AChE que par des forces de Van der Waals, s'en sépare aussitôt, ne laissant qu'une enzyme acétylée.

ii) l'enzyme acétylée, très avide d'électrons, réagit rapidement et facilement avec l'eau ou avec un donneur d'électrons, ce qui entraine la formation d'acide acétique et la régénération de l'enzyme.

D'autres étapes de réactions ont été proposées par plusieurs auteurs, en particulier par RYDON [1958] et BERNHARD [1959] mais, jusqu'à maintenant, elles ne sont que théoriques.

C – LES ANTICHOLINESTÉRASIQUES

Il existe plusieurs inhibiteurs des cholinestérases et, vu la nécessité de ces enzymes au maintien de l'activité nerveuse normale, ce sont des substances très toxiques.

1) Classification.

L'étude des agents anticholinestérasiques (antiChE) débute en 1864 lorsque JOBST et HESSE isolent un alcaloïde de la fève de Calabar, la physostigmine ou ésérine. Depuis, de nombreuses substances à action antiChE ont été découvertes et peuvent être classées parmi l'une des deux catégories suivantes:

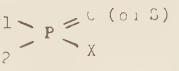
a) les anticholinestérases à action réversible, type physostigmine, néostigmine, ammoniums quaternaires. On les dit réversibles car le complexe enzyme-inhibiteur se dissocie assez facilement, par suite d'une dialyse de l'inhibiteur non combiné à l'enzyme; un état d'équilibre s'établit de la façon suivante:

$$\text{enzyme} - \text{inhibiteur} \rightleftharpoons \text{enzyme} + \text{inhibiteur}$$

Si, par un agent chimique, on obtient la réactivation de l'enzyme, l'inhibiteur est libéré sous sa forme originale, sans aucune modification de sa structure chimique.

b) les anticholinestérases à action "irréversible", dont les représentants les plus importants sont les organophosphorés.

Ils correspondent à la formule générale suivante (II)



(II)

dans laquelle R_1 et R_2 peuvent correspondre à des groupements:

- alcoyle, alcoyloxy, phenoxy ou leurs analogues soufrés
- amido, substitués ou non.

Quant au radical représenté par X, il doit être tel qu'il forme, par rapport à R_1 et R_2, une liaison labile avec le phosphore afin que le composé puisse être un agent phosphorylant. Il peut donc être un halogène, un cyanure, un thio-alcoyle, un aryloxy (WILSON [1963]).

On les qualifie "d'irréversibles" car, dans ce cas, il n'y a pas formation d'un état d'équilibre comme précédemment, même après dialyse de l'inhibiteur non combiné à l'enzyme. Si le complexe enzyme-inhibiteur n'est pas d'une irréversibilité totale, il est par contre très difficilement réversible et manifeste une stabilité relativement grande. Au niveau du site estérasique survient une réaction d'hydrolyse avec formation de l'enzyme phosphorylée, de telle sorte que l'inhibiteur n'est jamais retrouvé sous sa forme originelle. Il y a donc modification de sa structure chimique, même après régénération de l'enzyme par un réactivateur (type oxime).

2) Cinétique de l'interaction entre acétylcholinestérase et anticholinestérasique.

Les organophosphorés agissent par phosphorylation de l'AChE (AUGUSTINSSON et coll. [1949]) (NACHMANSOHN et coll. [1948]) selon les réactions présentées dans la Figure 3.

ALDRIDGE [1953a], WILSON et BERGMANN [1950a] ont émis l'hypothèse suivante: la phosphorylation de l'AChE par les organophosphorés serait la contrepartie de l'acétylation de la même enzyme par l'ACh, avec la différence que, dans ce dernier cas, l'hydrolyse du complexe suit immédiatement –d'où régénération de l'enzyme et formation d'acide acétique– alors que l'enzyme phosphorylée, au contraire, est stable.

Pour expliquer cette réaction, nous considérerons les points suivants:

a) la liaison P-X possède toutes les caractéristiques d'une liaison anhydride.

b) tous les substituants (R ou X) à propriété électropositive

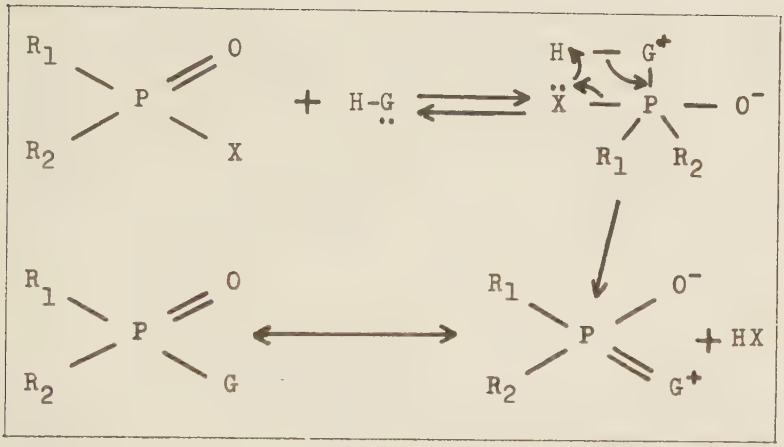


Figure 3: *Schéma de la phosphorylation de l'acétylcholinestérase par un organophosphoré* (WILSON [1952]).

croissante (ou à électronégativité décroissante) diminuent l'électrophilie de l'atome de phosphore de l'inhibiteur, car l'affinité électronique du phosphore diminue proportionnellement à l'augmentation de sa densité électronique. En effet, plus son avidité pour les électrons est satisfaite, moins il les attire et moins il est électrophile.

c) à une diminution de l'électrophilie du phosphore correspond une diminution parallèle du taux d'hydrolyse, car le groupement hydroxyle de l'eau sera moins fortement attiré.

d) si l'hydrolyse est faible, la phosphorylation de l'enzyme le sera également; il s'ensuivra une diminution de l'action anticholinestérasique (FUKUTO [1957]), puisque celle-ci est due à l'AChE phosphorylée.

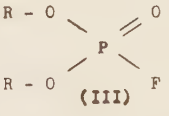
Le pouvoir anticholinestérasique d'un organophosphoré a donc son origine ultime dans l'électrophilie de l'atome de phosphore et son caractère électrophile est déterminé par R_1, R_2 et X (Formule II).

Considérons, par exemple, la série des fluorophosphates (Formule III). Si R est un méthyle et qu'on le substitue par un éthyle, radical plus électropositif que le premier, on diminue proportionnellement l'électrophilie de l'atome de phosphore et, par conséquent, le taux d'hydrolyse. De même, le remplacement du fluor dans la molécule de DFP par le chlore, halogène moins électronégatif, fait décroître l'électrophilie de l'atome de phosphore et le pouvoir antiChE de la molécule.

3) Métabolisme.

L'utilisation des éléments marqués de même que la mise

au point de nombreuses techniques nouvelles ont permis une étude de plus poussée du métabolisme de quelques organophosphorés. Cependant, les recherches doivent se poursuivre afin de mieux connaître toutes les réactions métaboliques auxquelles prennent part ces molécules.



(III)

a) absorption: les esters organophosphorés sont facilement absorbés par la peau, par les poumons (dans le cas de vapeurs) et par l'épithélium cornéen. Cette facilité de pénétration dans l'organisme exige que certaines précautions soient prises lors de la manipulation de tous ces produits. Toutefois, les principales voies d'administration chez l'animal sont les suivantes: intra-artérielle, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et buccale.

b) distribution: la plus grande concentration se retrouve dans le foie, les reins et les poumons; les muscles, le coeur et le cerveau n'en retiennent qu'une proportion beaucoup plus faible.

c) excrétion: après fixation de l'inhibiteur sur les ChE, l'acide (HX) est libéré et excrété dans les urines et les fécès. Le radical phosphoré, fixé sur la ChE, est lui-même éliminé sous forme d'acide phosphorique disubstitué lors du catabolisme protéinique de la ChE ou lors de la réactivation spontanée du complexe enzyme-inhibiteur (E–P). Cette réactivation spontanée existe, mais elle est plus ou moins rapide et est liée à la stabilité du complexe E–P, c'est-à-dire aux substitutions du groupement phosphorylé fixé sur l'enzyme. Ainsi, la déphosphorylation du diéthylphosphoryl–AChE est très lente (plusieurs semaines), tandis que celle du diméthylphosphoryl–AChE est beaucoup plus rapide (quelques heures).

d) transformations métaboliques: le métabolisme des organophosphorés, sauf dans quelques rares exceptions, est très mal connu, étant donné les difficultés rencontrées par les chercheurs dans l'identification des systèmes enzymatiques responsables de la détoxication ou de l'activation de ces substances. Au début de l'étude du métabolisme, on croyait que ces composés phosphorés exerçaient leur action d'une manière directe et que l'action des systèmes enzymatiques ne pouvait qu'amener la formation de produits moins ou non toxiques. Cependant, d'autres recherches montrèrent bientôt que la toxicité *in vivo* pouvait être

bien supérieure à ce que la détermination du pouvoir anticholinestérasique *in vitro* pouvait laisser prévoir. L'action antiChE *in vivo* peut être diminuée ou augmentée, selon le système enzymatique réagissant avec la substance considérée. En effet, selon leur configuration chimique, les organophosphorés, pour être pleinement actifs, doivent subir ou non des réactions d'activation. L'activité est donc liée tantôt à la molécule elle-même, tantôt à un produit métabolique. Nous étudierons brièvement chacune de ces deux possibilités.

Réactions d'activation métabolique.

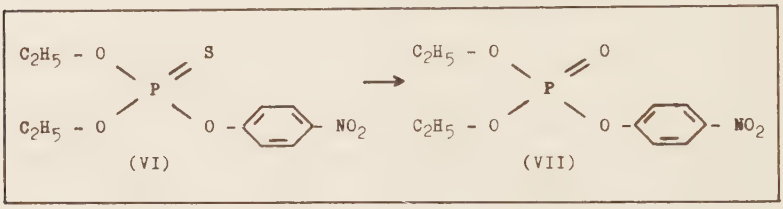
i) Organophosphorés à action antiChE *in vitro* et *in vivo:* ces substances agissent dans l'organisme sans avoir à subir de modifications préalables. Elles doivent alors correspondre à la Formule IV, où R_1=alcoyloxy, R_2=alcoyle, alcoyloxy, thio-alcoyle, et X=fluor, cyanure, alcoyloxy, thio-alcoyle, aryle, aryloxy. . .
Le DFP, le Sarin, le Tabun, le Para-oxon et tous les thiolophosphorés appartiennent à ce groupe.

ii) Organophosphorés à action antiChE uniquement *in vivo.* Ces substances, inactives *in vitro,* subissent dans l'organisme une activation par oxydation. En effet, il y a réaction d'oxydation lorsque la stabilité du composé originel est telle qu'il n'est pas suffisamment réactif pour manifester, comme tel, une action inhibitrice.

* Oxydation des phosphorothionates (Formule V).

Le Parathion, première substance de ce groupe à être synthétisée, a été très étudié et nous servira de prototype. DIGGLE et GAGE [1951] ont montré que si le Parathion (Formule VI) –lorsqu'utilisé à l'état pur, ou du moins à un degré de pureté suffisamment élevé pour que les impuretés (Para-oxon, paranitrophénol. . .) n'aient qu'un effet minime ou nul– avait une faible action antiChE *in vitro,* il était, au contraire, un puissant inhibiteur *in vivo.* Ce composé subit nécessairement une transformation dans l'organisme, ce qui fut démontré par des expériences d'incubation avec des coupes de foie de mammifères. Le métabolite à forte activité antiChE formé lors de cette incubation a

été identifié au Para-oxon (Formule VII). GAGE [1953], METCALF et MARCH [1953a] l'ont prouvé aussi bien chez l'animal que chez l'insecte. Le Parathion subit une oxydation métabolique de désulfuration *in vivo* pour former l'analogue oxygéné correspondant, responsable de la toxicité et de l'action antiChE. Plusieurs autres chercheurs ont prouvé que ce mode d'activation se retrouvait avec tous les autres phosphorothionates (METCALF et MARCH [1953b]) (MYERS et coll. [1953]) (DAVISON [1955]) (MURPHY et DUBOIS [1957]).



* Oxydation des thio-étherphosphorothionates (Formule VIII).

Les thionophosphorés à fonction thio-éther subissent une oxydation d'un type particulier. Il semble en effet que, dans ce cas, ce ne soit pas le composé phosphate qui soit actif, mais plutôt les sulfoxyde et sulfone correspondants. Cependant, les sulfoxy- et sulfophosphorothionates sont beaucoup moins stables que leurs isomères à forme thiolo.

* Oxydation des phosphoramides (Formule IX).

L'activation métabolique n'est pas le propre des seuls composés soufrés. On la retrouve aussi avec certains phosphoramides comme l'OMPA et le Diméfox* (bis – diméthylamido fluorophosphate) qui manifestent une faible activité antiChE *in vitro*, mais une forte action *in vivo*. Cette oxydation se fait selon les réactions suivantes (Figure 4):

Réactions de détoxication.

L'inactivation des organophosphorés résulte d'une hydrolyse enzymatique pouvant s'effectuer à différents niveaux

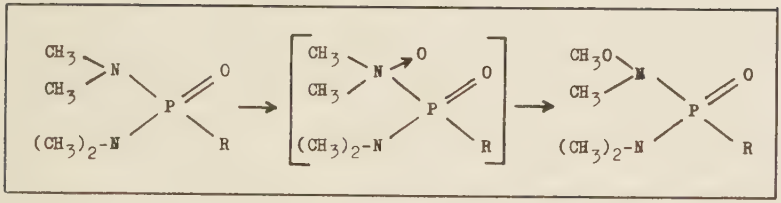


Figure 4: *Réactions d'oxydation de certains phosphoramides*

de l'organisme.

i) hydrolyse par des enzymes tissulaires: MAZUR [1946] a montré que plusieurs extraits tissulaires pouvaient hydrolyser le DFP et ses homologues. Les tissus qui manifestent le plus grand pouvoir hydrolytique sont le foie, le rein, les testicules, les muqueuses intestinales et le pancréas. On ignore encore si cette hydrolyse peut être réalisée par la plupart des tissus et si elle nécessite la présence d'un ou de plusieurs systèmes enzymatiques, spécifiques ou non. Cependant, les données actuelles permettent de penser qu'il n'y aurait qu'une seule enzyme responsable de l'hydrolyse des différents composés.

ii) hydrolyse par des estérases: MAZUR [1946] et ALDRIDGE [1951] ont observé, dans le sérum de Lapin et dans celui de plusieurs autres espèces de mammifères, la présence d'estérases non spécifiques capables d'hydrolyser certains organophosphorés comme le DFP, le Para-oxon, et autres. ALDRIDGE [1953b] a montré que le plasma contenait au moins deux groupes d'estérases, différentes des ChE, capables d'hydrolyser des esters aromatiques. Le premier, les A-estérases, n'est pas inhibé par les organophosphorés et hydrolyse plus rapidement les acétates que les butyrates. Le deuxième groupe, les B-estérases, présente des propriétés inverses. Cependant, d'autres travaux d'ALDRIDGE [1953b], d'AUGUSTINSSON [1954], de MOUNTER [1954], d'AUGUSTINSSON et HEIMBURGER [1955] semblent mettre en évidence dans le plasma la présence d'enzymes spécifiques des organophosphorés. On ne sait cependant pas encore si ces enzymes sont constituées par une enzyme unique ou par l'association de deux ou plusieurs enzymes.

D – RÉACTIVATION DES CHOLINESTÉRASES BLOQUÉES PAR LES ORGANOPHOSPHORÉS.

Si l'on a cru pendant longtemps que le complexe enzyme-inhibiteur était totalement irréversible, on sait maintenant qu'une certaine réversibilité existe. La vitesse de réactivation spontanée -déphosphorylation de l'enzyme- par l'eau varie en fonc-

tion des divers types d'AChE phosphorylées: celle des diméthylphosphoryl–AChE est plus rapide que celle de tout autre dialcoyloxyphosphoryl–AChE. Cependant, cette réaction de réactivation spontanée (Figure 5) est lente; c'est pourquoi des recherches furent entreprises dans le but de trouver des agents nucléophiles (1) doués de propriétés réactivatrices rapides.

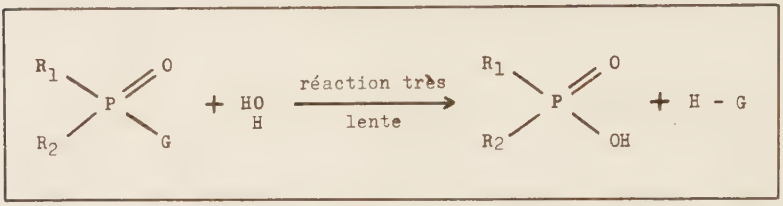


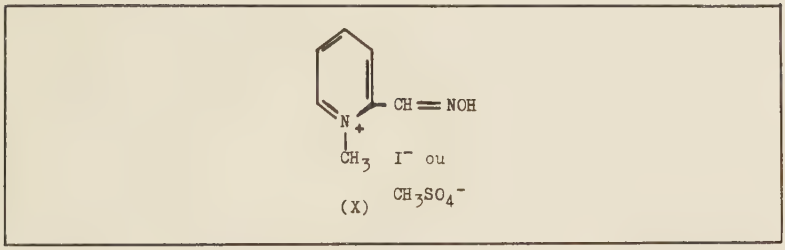
Figure 5: *Réaction de réactivation spontanée de l'acétylcholinestérase phosphorylée* (WILSON [1952]).

Les premiers travaux effectués dans ce domaine ne fournirent que de faibles réactivateurs. Ainsi, HAZARD et coll. [1950] [1952] montrèrent que la dihydro-oxycodéinone pouvait réactiver *in vitro* la pseudocholinestérase du sérum humain et du sérum de Cobaye bloquée par le DFP. WILSON et coll. [1950b] démontrèrent que l'hydroxylamine et la choline sont des accepteurs de groupements phosphorylés et que ces molécules avaient une action réactivatrice sur l'AChE phosphorylée.

Des progrès dans la recherche d'un réactivateur très actif furent obtenus avec certains acides hydroxamiques (acides picolino hydroxamique, 2-pyrimidino hydroxamique), mais ce n'est qu'avec les oximes que les meilleurs résultats furent obtenus (WILSON et GINSBURG [1955]). Plusieurs composés faisant partie du groupe des oximes ont été synthétisés. Nous ne retiendrons ici cependant que celui que nous avons utilisé dans notre expérimentation: le Pralidoxime (aussi appelé PAM, 7676 RP, Contrathion*: Formule X) (2). C'est un pyridinium aldoxime monoquaternaire, commercialisé sous forme d'iodure (PAM) ou de méthylsulfate (Contrathion*).

(1) Agents nucléophiles: les anions et les formes actives riches en électrons (comme les bases) sont caractérisés par la présence de doublets disponibles. Ils recherchent donc, lorsqu'ils sont instables, les centres de faible densité électronique. On traduit leur tendance à s'approcher des noyaux en les dénommant nucléophiles.

(2) Le méthylsulfate de pralidoxime nous a été gracieusement fourni par les laboratoires Specia.



Le grand pouvoir réactivateur de ce composé doit être attribué au complexe qu'il forme avec l'AChE phosphorylée et qui favorise la réactivation (Figure 6). L'existence de ce complexe semble supposer la formation d'une liaison entre le groupement ammonium quaternaire de l'oxime et le centre anionique de l'enzyme phosphorylée (WILSON [1955]).

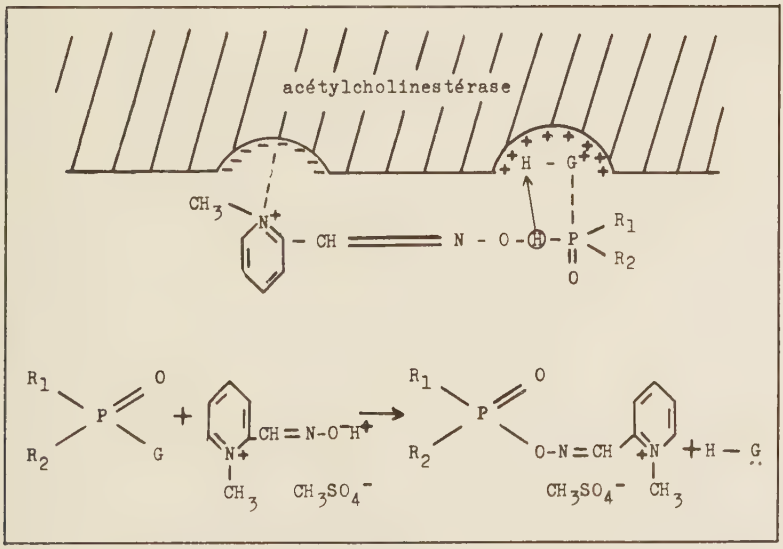


Figure 6: *Schéma de la réactivation par le Pralidoxime de l'acétylcholinestérase bloquée par un organophosphoré* (WILSON [1959]).

La vitesse de réactivation par ces agents est soumise aux facteurs suivants:

a) la concentration anionique du réactivateur et son pouvoir nucléophile,

b) la protonisation d'un groupement acide au niveau du centre estérasique de l'AChE phosphorylée.

c) la force de liaison entre l'oxime et l'AChE phosphorylée.

D'un point de vue pratique, il convient d'ajouter que:

– le pouvoir réactivateur de plusieurs oximes varie d'une espèce animale à une autre (Askew [1956]),

– les résultats obtenus, quant à la réactivation des ChE bloquées par un organophosphoré, ne peuvent être transférés à un autre organophosphoré, même si le type d'enzyme phosphorylée formée est identique,

– les recherches portant sur la vitesse de réactivation des ChE *in vitro* sont insuffisantes et doivent être complétées par des déterminations du pouvoir réactivateur *in vivo*. Ainsi, on pourra obtenir une idée plus exacte quant à l'efficacité de ces oximes.

– seuls certains types d'AChE et de BuChE (butyrylcholinestérases) phosphorylés peuvent être réactivés; cependant, plus la durée de l'inhibition enzymatique est prolongée, plus la liaison entre l'enzyme et l'inhibiteur est stable et plus le pouvoir réactivateur d'un agent nucléophile diminue.

II – ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

– CHIMIE

– PHARMACOLOGIE

CHIMIE

INTRODUCTION.

A – PRÉPARATION.

1) Thionophosphates:

a) 7900 H.C.
b) 8056 H.C., 8057 H.C., 8059 H.C., 8014 bis H.C.
i) purification:
-8056 H.C.
-8014 bis H.C.

ii) procédés de synthèse:
-réactions de synthèse des 8056 et 8057 H.C.
-réactions de synthèse des 8059 et 8014 bis H.C.

2) Thiolophosphates:

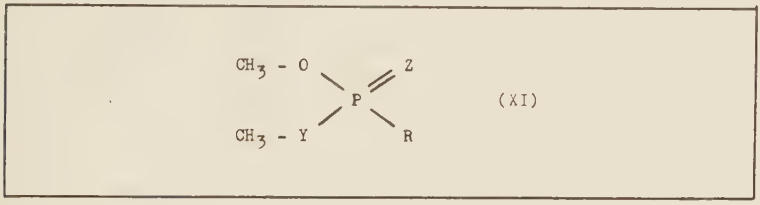
a) quaternarisation du composé.
b) réaction de double décomposition.

B – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.

C – CONSERVATION, MISE EN SOLUTION.

D – SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE.

Les composés que nous avons synthétisés font partie du groupe des organophosphorés soufrés et répondent à la formule générale suivante (Formule XI):



(XI)

dans laquelle:

O=oxygène, S=soufre,
R=alcoyloxy, aryloxy ou thio-alcoyle,

La nomenclature utilisée est la suivante:

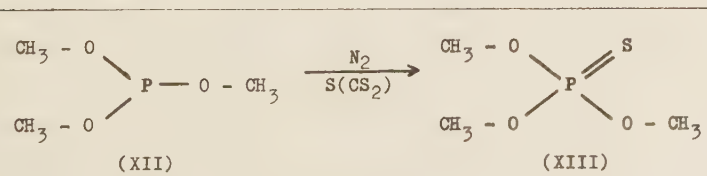
- si Y=O et Z=S: composés thionos, thionophosphates, phosphorothionates ou thionophosphorés.
- si Y=S et Z=O: composés thiolos, thiolophosphates, phosphorothiolates ou thiolophosphorés.

Nous avons réuni dans le Tableau II les formules des dix produits étudiés, de même que leur dénomination chimique.

A – PRÉPARATION

1) Thionophosphates.

a) 7900 HC: on dissout à chaud 0,5 mole de soufre dans 200 ml de sulfure de carbone (CS_2). Sous atmosphère d'azote, on ajoute progressivement à cette solution 0,5 mole de phosphite de triméthyle (Formule XII). La réaction est exothermique et maintient une légère ébullition. Lorsque l'adjonction de phosphite de triméthyle est terminée (environ 1 heure), on chasse le solvant par évaporation au bain-marie. On élimine l'excès de soufre par filtration et on purifie le triméthylthiophosphate (Formule XIII) par distillation sous pression réduite .



(XII) (XIII)

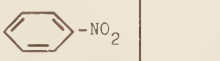
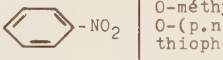
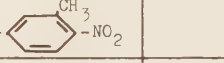
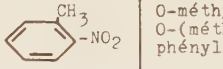
numéro conventionnel de l'Institut	Formule générale des Thionos R	Thiolos R	Nom chimique
7900 H.C.	-O-CH_3		O,O,O-triméthyl thiophosphate
7901 H.C.		-O-CH_3	O,O-diméthyl S-méthyl thiophosphate
8056 H.C.			O,O-diméthyl O-(p.nitrophényl) thiophosphate
8061 H.C.			O-méthyl S-méthyl O-(p.nitrophényl) thiophosphate
8057 H.C.			O,O-diméthyl O-(méthyl-3 nitro-4 phényl) thiophosphate
8062 H.C.			O-méthyl S-méthyl O-(méthyl-3 nitro-4 phényl) thiophosphate
8059 H.C.	-S-CH-COO-C_2H_5 / CH_2-COO-C_2H_5		O,O-diméthyl S-(dicarbéthoxy-1,2 éthyl) dithiophosphate
8063 H.C.		-S-CH-COO-C_2H_5 / CH_2-COO-C_2H_5	O-méthyl S-méthyl S-(dicarbéthoxy-1,2 éthyl) dithiophosphate
8014 bis H.C.	-S-CH_2-CO-NH-CH_3		O,O-diméthyl S-(N-méthylacétamido) dithiophosphate
8014 H.C.		-S-CH_2-CO-NH-CH_3	O-méthyl S-méthyl S-(N-méthylacétamido) dithiophosphate

Tableau II: *Structure chimique des corps de la série étudiée.*

b) 8056 HC (Méthylparathion) 8057 HC (Sumithion)
8059 HC (Malathion) 8014 bis HC (Diméthoate, Rogor*)

Ces produits nous ont été gracieusement fournis par les Laboratoires Péchiney-Progil. Les 8057 HC et 8059 HC présentaient un degré de pureté suffisant pour permettre une utilisation immédiate, sans nécessiter une purification préalable, comme ce fut le cas pour les 8056 HC et 8014 bis HC.

i) Purification.

*8056 HC : le produit "technique" que nous avons reçu était constitué d'une partie cristalline et d'une phase huileuse jaune pâle (p.nitrophénol, traces d'isomères). Le protocole suivant a été adopté: on dissout le produit "technique" dans le méthanol. Le refroidissement de la solution provoque la recristallisation du 8056 HC, tandis que l'alcool méthylique retient en solution la partie huileuse de même que les impuretés des cristaux. On filtre et on répète trois fois la même opération, puis on sèche le produit sous vide dans un dessiccateur.

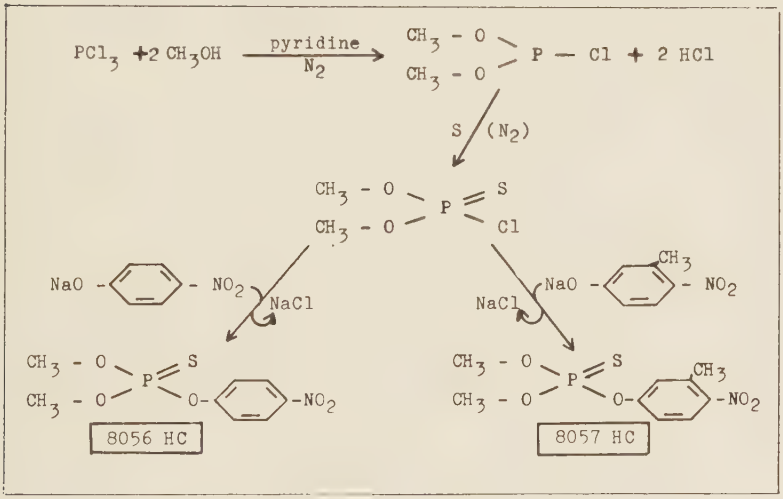


Figure 7: *Réactions de synthèse des 8056 HC et 8057 HC.*

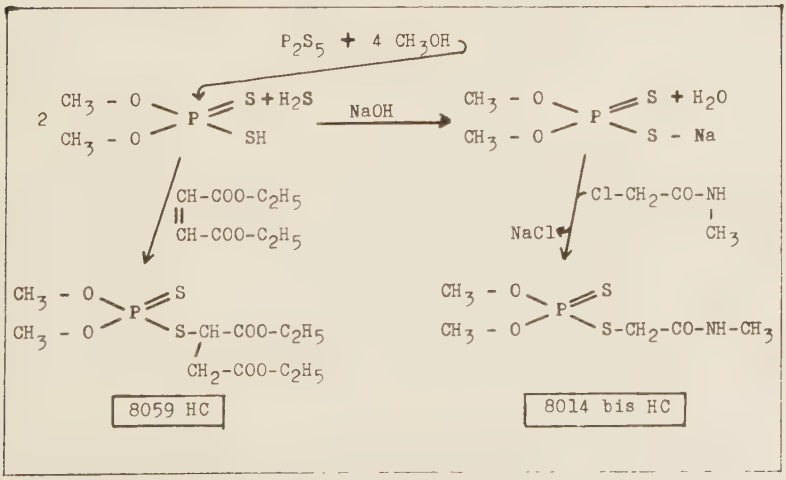


Figure 8: *Réactions de synthèse des 8059 HC et 8014 bis HC.*

*8014 bis HC : le même protocole expérimental que précédemment a été suivi, mais ce corps étant lui-même très soluble dans le méthanol, ce solvant a été remplacé par le chloroforme.

ii– Procédés de synthèse: les principales étapes de synthèse des différents thionophosphates sont réunies dans les figures 7 et 8.

2) Thiolophosphates.

Dans la littérature, le procédé habituellement décrit pour l'isomérisation de la forme thiono en forme thiolo repose sur l'utilisation de la chaleur. Ainsi, il suffit de chauffer un thionophosphate à une température généralement supérieure à 150°C -température à laquelle ce thionophosphate devient instable et s'isomérise- pour donner naissance au thiolophosphate correspondant. Cette méthode a le désavantage de fournir un thiolophosphate souvent impur, à cause des traces plus ou moins importantes de thiono non isomérisé et autres composés résultant de la pyrolyse.

Le Département de Chimie de l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris a mis au point une méthode originale permettant l'obtention des thiolophosphates à l'état pur. Elle repose sur les réactions suivantes (Figure 9) qui s'effectuent en deux temps principaux (CHABRIER et coll. [1957]) (CHEYMOL et coll. [1958]):

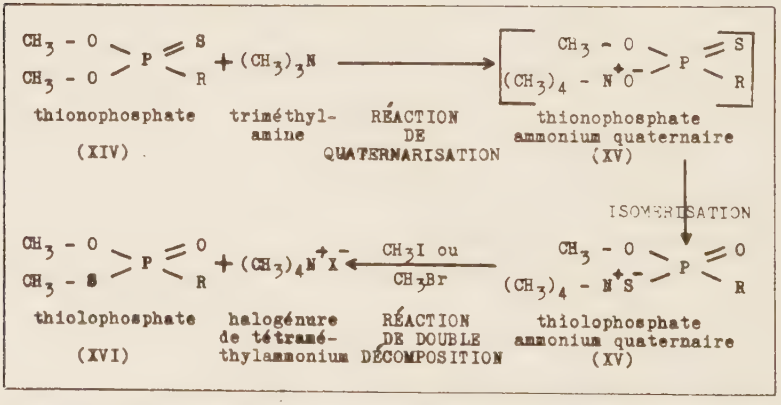


Figure 9: *Réactions d'isomérisation d'un thionophosphate en thiolophosphate.*

Mode opératoire:

a) quaternarisation du composé: dans un flacon "pyrex" très épais, on mélange le composé thiono (Formule XIV) avec un excès de triméthylamine en solution dans l'acétone anhydre. Le

flacon est soigneusement bouché. Le début de la réaction est généralement assez rapide: échauffement puis précipitation de l'ammonium quaternaire (Formule XV). On laisse reposer une douzaine d'heures, afin que la réaction soit complète. On filtre rapidement, car l'ammonium quaternaire est très hygroscopique. On lave le précipité avec de l'acétone anhydre et le produit est mis sous vide dans un dessiccateur, afin d'éliminer toute trace de solvant et de triméthylamine.

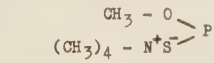
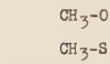
Thionophosphate		Réaction de QUATERNARISATION 			Thiolophosphate  Double décomposition		
numéro conventionnel H.C.	P.M.	rendement de la réaction	ammonium quaternaire P.M.	ammonium quaternaire point de fusion en °C	numéro conventionnel H.C.	P.M.	rendement de la réaction
7900	156	90 %	215	98	7901	156	80 %
8056	263	67 %	322	167	8061	263	82 %
8057	277	78 %	336	190	8062	277	76 %
8059	330	69 %	389	huile épaisse, cristallisable mais cristaux déliquescents	8063	330	82 %
8014 bis	228	75 %	288	cristaux très hygroscopiques	8014	228	78 %

Tableau III: *Caractéristiques des réactions de quaternarisation et de double décomposition et des composés obtenus.*

numéro conventionnel H.C.	Carbone pour 100		Hydrogène pour 100		Phosphore pour 100		Soufre pour 100		Azote pour 100	
	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.
8061	36,5	36,32	3,8	3,92	11,8	11,4	12,16	12,05	5,32	5,29
8062	42,8	42,89	6,25	6,38	9,23	9,52	9,38	9,56	5,05	5,20
8063	36,3	36,54	5,76	5,71	9,39	9,30	19,4	19,57	-	-
8014	26,21	26,25	5,24	5,18	13,54	13,31	28,0	28,04	6,12	6,0

Tableau IV: *Pourcentage des différents éléments des thiolophosphorés fourni par l'analyse (trouvé) ou calculé.*

Dans le cas du 8059 HC, il est nécessaire d'utiliser une solution aqueuse de triméthylamine dans l'éther, car le composé ammonium quaternaire est soluble dans l'acétone

b) réaction de double décomposition: dans un flacon "pyrex" très épais, on introduit l'ammonium quaternaire (Formule

XV) en solution dans le chloroforme; on ajoute un excès d'halogénure de méthyle (soit l'iodure de méthyle, soit une solution chloroformique de bromure de méthyle). La précipitation du bromure ou de l'iodure de tétraméthylammonium est assez rapide. On bouche le flacon et on laisse au repos une douzaine d'heures. Après cette période de repos, on filtre afin d'éliminer l'halogénure de tétraméthylammonium; on lave le filtrat (thiolophosphate: Formule XVI) avec une solution de bicarbonate de sodium, puis avec de l'eau distillée. L'isodiméthoate (8014 HC) étant soluble dans l'eau, il faut utiliser un volume minimum. On sèche sur sulfate de sodium anhydre et on évapore sous vide. Le résidu est alors soit distillé sous vide poussé, soit ulitisé sans purification supplémentaire.

Remarque: les ammoniums quaternaires dérivant du 8056 HC et 8057 HC sont peu solubles dans le chloroforme; la réaction a donc lieu en phase hétérogène.

Les caractéristiques des corps et de la réaction d'isomérisation, de même que les résultats d'analyse des thiolophosphates figurent dans les Tableaux III et IV.

B – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.

Les produits que nous avons étudiés se présentent sous une forme liquide, à l'exception des 8056 HC et 8014 bis HC, et possèdent une odeur très désagréable. La solubilité dans l'eau varie d'un composé à l'autre, allant de très soluble (7901 HC, 8014 HC) et soluble (8014 bis HC) à une insolubilité presque totale pour tous les autres. Ainsi, le 8056 HC a une solubilité approximative de 0,005 % dans l'eau à 25°C. Cependant, les thiolos sont en général plus solubles dans l'eau que les thionos correspondants, mais ils sont moins stables.

Ces composés sont peu solubles dans les hydrocarbures aliphatiques, mais le sont entièrement dans les acides, les alcools, les cétones, le chloroforme, les huiles animales et végétales, les hydrocarbures aromatiques et le propylène glycol (Negherbon [1959]).

La chaleur et l'humidité produisent une perte progressive de l'activité antiChE. Ainsi, le 8059 HC, après conservation pendant 21 jours à une température de 33,5°C et dans un milieu contenant 55 p.100 d'humidité relative, voit son activité diminuer de 22 p.100. Tous ces dérivés de l'acide orthophosphorique sont hydrolysés en milieu alcalin; les thiolos le sont plus rapidement que les thionos. Par contre, ils sont relativement stables en milieu acide ou neutre; les solutions ou suspensions

aqueuses neutres peuvent en effet être généralement conservées pendant plusieurs jours (NEGHERBON [1959]). Ceci ne se vérifie pas cependant avec les 7900 HC et 7901 HC: l'hydrolyse de ces composés en milieu aqueux semble être assez rapide puisqu'au contact de l'eau, on observe immédiatement des émissions de vapeurs. En fait, la simple exposition de ces deux substances à l'humidité de l'air atmosphérique entraîne le même phénomène.

Nous avons réuni dans le Tableau V quelques propriétés physiques des dérivés étudiés; nous y avons également inscrit le degré de pureté de chacun d'entre eux.

numéro conventionnel H.C.	pureté des produits	état	couleur	solubilité dans l'eau	point d'ébullition °C/mm Hg	point de fusion °C	indice de réfraction n^{20}_D
7900	pur	liquide	incolore	-	77/16		1,4455
7901	pur	liquide	incolore	+	102/15		1,4600
8056	technique purifié	cristallin	blanche	-		35	
8061	pur	liquide	brune	-			1,5621
8057	technique 95 %	liquide	ambrée	-	145/0,1		1,5538
8062	pur	liquide	orangée	-			1,5605
8059	technique 92 %	liquide	jaune pâle	-	157/760		1,4940
8063	pur	liquide	jaune pâle	-			1,5030
8014 bis	technique purifié	cristallin	blanche	+		51	
8014	pur	liquide	jaune -brun	+			1,5500

Tableau V: *Propriétés physiques des thiophosphorés étudiés.*

C – CONSERVATION, MISE EN SOLUTION.

Afin d'éviter toute altération des produits par l'humidité de l'air, la chaleur ou la lumière, ceux-ci, aussitôt synthétisés, sont conservés dans des ampoules scellées, à l'abri de la lumière et à une température de 4°C. Ces précautions ont été strictement maintenues pendant toute la durée de l'expérimentation pharmacologique.

Pour chaque substance et pour chacune des doses utilisées, la quantité nécessaire a été pesée et mise en solution dans le solvant approprié au moment même de son utilisation. Ce protocole a été adopté afin d'éliminer toute cause d'erreur, pouvant provenir d'un début d'hydrolyse.

D – SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE.

Comme substance de référence, nous avons choisi le 0,0-diéthyl 0-(p.nitrophényl) phosphate (E. 600, Para-oxon: Formule VII) Selon les expériences réalisées nous avons utilisé soit le Para-oxon à l'état pur, (détermination du pouvoir antiChE et essais de toxicité), soit (dans les autres cas) le Para-oxon adsorbé à 1,5 % sur du chlorure de sodium (Mintacol*) (1).

Outre le Para-oxon, nous avons également employé le TEPP (Formule XVII) comme deuxième substance de référence, lors des déterminations de la toxicité, du pouvoir anticholinestérasique et de l'action neuromusculaire. Le procédé de synthèse que nous avons utilisé est le suivant:

à 3 moles d'éthanol absolu et un égal volume de benzène sec, on ajoute, en refroidissant très énergiquement à l'aide d'un bain de glace et de sel,

–1 mole de PCl_3 dans un égal volume de benzène sec (la température étant maintenue entre 0° et 8°C).

–puis 1 mole de SO_2Cl_2.

Le mélange réactionnel est alors soumis au vide d'une trompe à eau pour éliminer le HCl gazeux qui se forme. Après évaporation du benzène sous vide, suivie d'une distillation, on obtient un liquide incolore, le diéthylmonochlorophosphate (Formule XVIII) aux constantes suivantes: Eb.: 84°C/760 mm Hg et n_D^{20}: 1,4172. Le rendement de cette réaction est de 80 p.100.

A une solution de méthylate de sodium dans le méthanol, on ajoute le diéthylmonochlorophosphate, la température étant toujours maintenue entre 0° et 8°C. On agite pendant quelques heures; on filtre pour éliminer le chlorure de sodium formé; on distille le méthanol, puis l'ester (diéthylméthylphosphate: Formule XIX), huile incolore dont le point d'ébullition est de 92°C/760 mm Hg. Le rendement de cette réaction est de 78 p.100.

On fait réagir le diéthylméthylphosphate avec la triméthylamine en excès solubilisée dans l'acétone (réaction de quaternarisation). On chauffe au bain-marie pendant quelques heures, puis on recueille le précipité par filtration. Après lavage et élimination, par filtration, des traces de solvant et de triméthylamine, on obtient, avec un rendement de 92 p.100, des cristaux blancs d'ammonium quaternaire (Formule XX).

Ce sel d'ammonium est alors placé en présence de la quantité calculée de diéthylmonochlorophosphate solubilisé dans l'éther. On filtre pour éliminer le chlorure de tétraméthylam-

---

(1) Le Para-oxon et le Mintacol* nous ont été gracieusement fournis par la maison Bayer.

monium formé; la solution est concentrée, puis distillée une première fois. Le TEPP ainsi obtenu possède les constantes suivantes: Eb.: 120°C/0,1 mm Hg et n_D^{20}: 1,4165.

Le produit est distillé une seconde fois afin d'obtenir le TEPP (Formule XVII) à un degré de pureté plus élevé: c'est un liquide incolore, dont le point d'ébullition est de 116°C/0,1 mm Hg. Le rendement de cette réaction est de 53 p.100.

Les réactions effectuées lors de la synthèse de ce composé sont réunies dans la Figure 10.

Les mêmes précautions de conservation et de mise en solution, préalablement décrites, ont également été observées pour le Para-oxon et le TEPP.

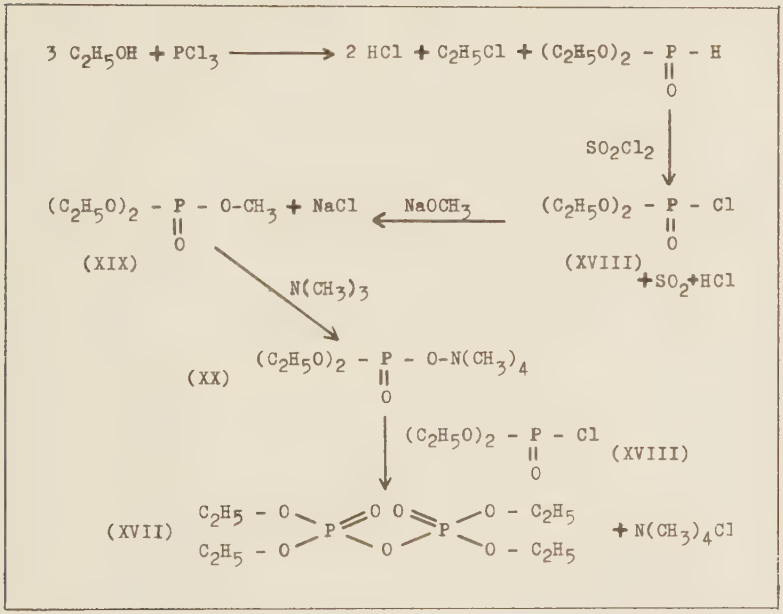


Figure 10: *Réactions de synthèse du TEPP.*

PHARMACOLOGIE

PREMIÈRE PARTIE

DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE

INTRODUCTION.

A – MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DES CHOLINESTÉRASES.
- 1) Méthode manométrique d'AMMON.
- 2) Méthode colorimétrique d'HESTRIN.
- 3) Méthode titrimétrique de STEDMAN et WHITE.
- 4) Méthode électrométrique de MICHEL,
- 5) Méthode électrométrique et titrimétrique d'EINSEL.

B – DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VITRO* PAR LA MÉTHODE DE MICHEL.
- 1) But de la technique.
- 2) Caractéristiques de la méthode.
- 3) Appareils utilisés.
- 4) Réactifs:
  - a) substrat.
  - b) inhibiteur
  - c) tampons de MICHEL.
  - d) source enzymatique:
    - i) pseudocholinestérases,
    - ii) acétylcholinestérases.
- 5) Mode opératoire.
  - a) étalonnage de la préparation enzymatique.
  - b) inhibition enzymatique par les organophosphorés.
- 6) Expression des résultats.
- 7) Essai d'interprétation des résultats.

C – DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VIVO* PAR LA MÉTHODE DE MICHEL.
- 1) Mode opératoire:
  - a) détermination du pouvoir cholinestérasique du plasma,
  - b) détermination du pouvoir cholinestérasique des hématies
- 2) Résultats expérimentaux;
  - a) pseudocholinestérases,
  - b) acétylcholinestérases.

La détermination du pouvoir antiChE *in vitro* constitue la première étape lors de l'étude pharmacologique d'un composé organophosphoré à action anti-enzymatique. Elle permet de situer leur activité par rapport à celle de dérivés déjà connus, mais la première classification qui en résulte ne doit en aucun cas être considérée comme définitive. On sait, en effet, que de nombreuses substances, inactives *in vitro*, sont métabolisées *in vivo* et donnent naissance à un métabolite à très forte action inhibitrice.

A – MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DES CHOLINESTÉRASES.

Plusieurs méthodes de détermination de l'activité cholinestérasique ont été décrites par de nombreux auteurs: elles peuvent être classées en cinq groupes principaux:

1) Méthode manométrique: la méthode d'AMMON [1933], bien que la plus ancienne, sert toujours de référence. Elle consiste à mesurer dans l'appareil de WARBURG, la pression du gaz (CO_2) formé par la réaction entre le bicarbonate de sodium et l'acide acétique provenant de l'hydrolyse de l'ACh par les ChE. Un calcul simple et rapide permet, à partir de la pression obtenue, de déterminer le nombre de micromoles d'acide acétique libéré par unité de temps.

2) Méthode colorimétrique: la technique d'HESTRIN [1949] repose sur la réaction colorée suivante: l'acétylcholine non hydrolysée donne, en présence d'hydroxylamine, un acide hydroxamique formant un complexe soluble rouge-pourpre avec les ions ferriques. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ACh.

3) Méthode titrimétrique: en présence d'un indicateur -comme le rouge de crésol- et après un temps donné, on titre, par la soude, la quantité d'acide acétique formé lors de l'hydrolyse de l'ACh (STEDMAN et WHITE [1933]).

4) Méthode électrométrique ou méthode de MICHEL [1949]: le degré d'activité cholinestérasique d'un milieu réactionnel -constitué, d'une part, du substrat (ACh) et, d'autre part, de la source enzymatique en solution dans un système tampon- est obtenu indirectement par la mesure de l'abaissement de *p*H se produisant en un temps donné.

5) Méthode électrométrique et titrimétrique: EINSEL et coll. [1956] ont mis au point une méthode basée à la fois sur les procédés titrimétrique et électrométrique: l'utilisation d'un titrateur automatique réagissant à toute variation de *p*H permet une neutralisation continue de l'acide acétique libéré. La réaction se fait donc à *p*H constant. C'est le procédé idéal dont le seul inconvénient est le prix de revient élevé.

Pour déterminer le pouvoir antiChE de nos produits, nous avons utilisé la méthode de MICHEL, modifiée par TAMMELIN [1953] et adaptée à l'étude des agents antiChE par TAMMELIN et STRINDBERG [1952]. Plusieurs raisons ont motivé ce choix: cette méthode peu coûteuse est simple et relativement rapide; de plus, elle est utilisée depuis plusieurs années à l'Institut de Pharmacologie (G. CHEYMOL [1962], CHOISY [1962], DEGRELLE et TILLEMENT [1964a, 1964b], TILLEMENT et DEGRELLE [1964].

Etudiant l'effet d'une série de dérivés organophosphorés, ces auteurs ont pu constater que les résultats obtenus, soit avec la méthode de MICHEL, soit avec celle d'AMMON, étaient tout à fait comparables. TAMMELIN et STRINDBERG [1952] avaient aussi comparé les deux méthodes en transformant les valeurs obtenues (variation du *p*H d'une part et volume de gaz carbonique dégagé d'autre part) en micromoles d'acide acétique libéré par minute; grâce à cet artifice, ces auteurs ont montré que les deux méthodes avaient une sensibilité identique.

B – DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VITRO* PAR LA MÉTHODE DE MICHEL

1) But de la technique.

On ajoute au milieu réactionnel des quantités croissantes d'organophosphorés de façon à obtenir des inhibitions enzymatiques variant entre 0 et 100 p. 100. On cherche ensuite à déterminer la concentration de l'inhibiteur diminuant de 50 p. 100 (I_{50}) l'activité de l'enzyme.

2) Caractéristiques de la méthode.

La caractéristique principale de cette méthode réside dans la force du tampon utilisé. Ce tampon doit être suffisamment fort pour s'opposer à une trop grande variation de *p*H -une variation supérieure à 1,20 unités modifie la vitesse d'hydrolyse-, mais assez faible pour que cette variation soit appréciable (0,6 à 0,8 unité/heure). Il est également nécessaire d'ajuster soigneusement:

- la concentration du substrat (l'AChE est inhibée par un excès d'ACh),
- la concentration ionique du milieu (un excès de sels minéraux diminue la vitesse d'hydrolyse),
- la concentration en enzymes.

3) Appareils utilisés.

Nous avons utilisé un *p*H-mètre "Radiometer-22". A l'aide d'une résistance supplémentaire introduite dans l'appareil, nous pouvons doubler la sensibilité, rendant possible des lectures à 0,01 unité près. Nous avons adopté les modifications

proposées par TAMMELIN [1953] permettant la réalisation de six dosages simultanés: six électrodes de verre "Radiometer" type G-202-B sont reliées, par des cables blindés, à un contacteur à six positions, lui-même relié au *p*H-mètre. Une seule électrode au calomel ("Radiometer" type K-401) plonge dans un réservoir rempli d'une solution saturée de chlorure de potassium. Le réservoir est relié aux électrodes de verre par des tubes de polyvinyle, eux-mêmes remplis de la même solution et qui servent de ponts. Chaque extrémité de ces ponts est constituée par un tube de verre légèrement effilé, rempli de laine d'amiante. Ainsi, et à la condition que l'extrémité des ponts soit située à un niveau inférieur au réservoir, un faible courant s'établit dans la solution allant de celui-ci vers les terminaisons.

Le milieu réactionnel est placé dans des tubes coniques de 25 ml plongeant dans un bain-marie maintenu à une température de 25°C.

4) Réactifs.

a) substrat: solution d'acétylcholine à 1 p. 100 (renouvelée tous les jours).

b) inhibiteur: la concentration de la solution est ajustée de telle sorte que la quantité nécessaire de produit est solubilisée dans 0,1 ml d'eau distillée. Ceci ne put cependant être réalisé qu'avec les 7901, 8014 et 8014 bis HC, ainsi qu'avec le TEPP et le Para-oxon. En raison de la faible solubilité dans l'eau des autres dérivés, ce solvant a dû être remplacé par:

- 0,1 ml d'éthanol à 10° pour les 7901, 8061, 8057, 8062 et 8063 HC,
- 0,1 ml d'éthanol à 95° pour les 8056 et 8059 HC (1).

c) tampons de MICHEL

	Tampon à *p*H 8,0 pour pseudocholinestérases	Tampon à *p*H 8,1 pour acétylcholinestérases
barbital sodique	1,2371 g	4,1236 g
phosphate monopotassique .	0,1361 g	0,5446 g
chlorure de sodium	17,535 g	. . . .
chlorure de potassium . . .	. . . .	44,730 g
acide chlorhydrique N/10 .	11,6 ml	28,0 ml
eau distillée . . compléter à	1000 ml	compléter à 1000 ml

d) source enzymatique:

i) pseudocholinestérases: on utilise le sérum de Poulain (2), qui constitue une source riche en pseudoChE. La con-

(1) L'emploi de l'éthanol comme solvant est discuté à la page 95).

(2) fourni gracieusement par l'Institut Pasteur.

servation s'effectue dans des ampoules scellées de 10 ml maintenues à une température de -20°C. Au moment de l'utilisation, on mélange le sérum avec du tampon de MICHEL dilué au demi de manière à obtenir une solution à 7 p. 100.

ii) acétylcholinestérases: comme source d'AChE, on utilise le cerveau de Cobaye (hémisphères, bulbe, cervelet), prélevé et broyé dans un POTTER selon la technique décrite par HAZARD et DELGA [1952].

On mélange avec du tampon MICHEL (pour acétylcholinestérases) dilué au demi pour obtenir une suspension à 5 p. 100; on filtre sur gaze. Cette suspension doit être utilisée le jour même.

Nous tenons ici à signaler que nous avions d'abord quelques scrupules à nous servir d'une suspension pour déterminer le pouvoir antiChE par la méthode de MICHEL, celle-ci ne permettant aucune agitation pendant le dosage. Cependant, nous reportant aux expériences réalisées dans les mêmes conditions par G. CHEYMOL [1962] et CHOISY [1962], de même qu'aux essais préliminaires que nous avons cru nécessaires d'effectuer, nous avons constaté que, malgré cet inconvénient, la variation du *p*H (ΔpH) après un temps donné était toujours constante et que les résultats étaient parfaitement reproductibles.

5) Mode opératoire.

a) étalonnage de la préparation enzymatique: dans un tube conique, on introduit:

- 0,1 ml d'eau distillée ou du solvant utilisé,
- 1,9 ml de solution de pseudocholinestérases ou de suspension d'acétylcholinestérases,
- 2,0 ml du tampon de MICHEL.

On laisse pendant quelques minutes le milieu s'équilibrer à la température du bain-marie (25°C); on ajoute alors

- 1,0 ml de solution d'ACh à 1 p. 100. On agite pendant quinze secondes et on plonge le couple d'électrodes (électrode de verre et électrode constituée par le pont de solution saturée de chlorure de potassium). On note le *p*H initial au temps 0 (pH_0).

Le contacteur à six positions permet un démarrage simultané de six réactions. Il est préférable de faire un minimum de trois déterminations par dosage. La température de 25°C est maintenue pendant toute la durée de la réaction. Une heure plus tard, on lit de nouveau le *p*H final (pH_1). La différence $pH_1 - pH_0 = \Delta pH$ étalon. Cette valeur est d'environ 0,72 unité *p*H pour les pseudocholinestérases et de 0,65 pour les acétylcholinestérases.

Puisque nous avons dû utiliser l'éthanol à 10° et à 95° comme solvant pour certains produits, nous avons vérifié, à l'aide d'essais témoins, que les résultats ne sont pas modifiés par lui.

b) inhibition enzymatique par les organophosphorés: le protocole expérimental suivi lors de la détermination du pouvoir inhibiteur d'un organophosphoré est identique à celui employé pour l'étalonnage de la préparation enzymatique. Seuls, les 0,1 ml d'eau distillée ou d'éthanol sont remplacés par un même volume de solution aqueuse ou alcoolique contenant la quantité appropriée d'inhibiteur. Un point de l'expérimentation s'avère cependant très important: l'action inhibitrice ne se manifeste que si le temps de contact entre l'inhibiteur et l'enzyme est suffisamment prolongé. A la suite d'essais préliminaires, ce temps de contact a été fixé à 30 minutes; c'est seulement à ce moment qu'on ajoute l'ACh. On obtient ainsi la valeur du *p*H (ΔpH dosage). On transforme les valeurs trouvées en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante:

$$\frac{\Delta p\text{H étalon} - \Delta p\text{H dosage}}{\Delta p\text{H étalon}} \times 100 = \%\ \text{d'inhibition (I)}$$

6) Expression des résultats.

En utilisant diverses concentrations d'inhibiteurs, on cherche à déterminer 3 ou 4 points correspondant à des inhibitions comprises entre 10 et 90 p. 100. Si on trace une courbe en portant en ordonnée le pourcentage d'inhibition et, en abcisse, les doses croissantes exprimées en μg pour 5 ml, on obtient une courbe sigmoïde.

Pour faciliter la lecture des résultats -surtout celle des valeurs de I_{50}-,il est possible de transformer cette sigmoïde en une droite grâce aú papier logarithme-probabilité utilisé pour les courbes de toxicité; on porte, en ordonnée, le pourcentage d'inhibition selon l'échelle des probits et, en abcisse, le logarithme de la dose. On peut alors facilement calculer I_{50}.

Nous avons réuni dans la Figure II les courbes d'inhibition des dérivés de la série étudiée. Nous remarquerons que certains composés -les 7900, 7901, 8056, 8059 et 8014 bis HC-n'y figurent pas, puisqu'ils sont inactifs *in vitro* comme inhibiteurs des ChE.

Dans le Tableau VI, nous avons exprimé les valeurs de I_{50} tant sur les pseudo- que sur les acétylcholinestérases. Il permet la comparaison des activités antiChE entre les isomères et aussi entre les homologues.

7) Essai d'interprétation des résultats.

Si on analyse les résultats figurant dans le Tableau VI, une première constatation est évidente: tous les thiolophosphates, à l'exception du 7901 HC, sont actifs sur les pseudoChE et

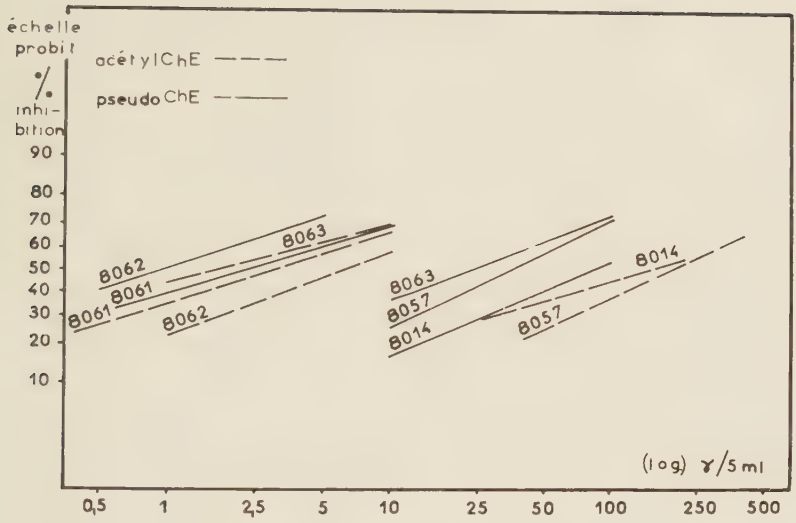


Figure 11: *Courbes d'inhibition in vitro des pseudo- et des acétylcholinestérases par les dérivés organophosphorés de la série étudiée.*

sur les AChE, alors que tous les thionophosphates, le 8057 HC excepté, sont inactifs. Si le 7901 HC est inactif à cause de sa formule chimique, (et plus spécifiquement à cause de R = O-CH_3), nous pensons au contraire que l'action inhibitrice manifestée par le 8057 HC n'est pas spécifique du composé lui-même, mais qu'elle est liée aux impuretés (probablement aux traces d'isomères) qu'il contient. Cet argument est renforcé non seulement par le fait que le degré de pureté n'est que de 95 p. 100 et que le produit n'a subi aucune purification préalable -comme ce fut le cas pour les 8056 et 8014 bis HC-, mais encore par les valeurs mêmes de I_{50}. En effet, lors de la détermination du pouvoir anti-pseudoChE *in vitro,* nous avons trouvé, comme valeurs de I_{50}:

– 1 μg/5 ml pour le 8062 HC
– 33 μg/5 ml pour le 8057 HC

Nous en avons conclu que si l'action inhibitrice du 8057 HC résultait effectivement de la présence d'impuretés ou de traces d'isomères, nous devions obtenir, avec les AChE, des valeurs de I_{50} qui seraient dans un même rapport de 33 à 1. Or, c'est précisément ce que nous avons obtenu: les valeurs de I_{50} correspondent en effet à une concentration de 6 μg/5 ml pour le 8062 HC et à celle de 190 μg/5 ml pour le 8057 HC. Notre hypothèse de départ semble donc tout au moins partiellement prouvée.

Si on compare l'activité des différents thiolophosphates, on peut déduire les observations suivantes:

numéro conventionnel H.C.	CH_3-O, CH_3-Y, P, Z, R			Pouvoir anticholinestérasique exprimé en inhibition 50 p. 100 en µg/5 ml	
	R	Y	Z	pseudoChE	acétylChE
7900	-O-CH_3	O	S	>1000	>1000
7901		S	O	>1000	>1000
8056	-O-C$_6$H$_4$-NO_2	O	S	>1000	>1000
8061		S	O	2,2	2,7
8057	-O-C$_6$H$_3$(CH_3)-NO_2	O	S	33	190
8062		S	O	1	6
8059	-CH(CH_2-COO-C_2H_5)-COO-C_2H_5	O	S	>1000	>1000
8063		S	O	22,5	1,7
8014 bis	-S-CH_2-CO-NH-CH_3	O	S	>1000	>1000
8014		S	O	80	140
P -O.	(C_2H_5-O)$_2$P(=O)-O-C$_6$H$_4$-NO_2			0,006	0,065
TEPP	(C_2H_5-O)$_2$P(=O)-O-P(=O)(O-C_2H_5)$_2$			0,0008	,025

Tableau VI: *Inhibition 50 p. 100 déterminée par la méthode de* MICHEL *sur les pseudo- et sur les acétylcholinestérases.*

a) l'action inhibitrice des 8061, 8062 et 8014 HC est supérieure vis-à-vis des pseudoChE -comme c'est également le cas du Para-oxon et du TEPP- alors que celle du 8063 HC l'est davantage vis-à-vis des AChE.

b) la fixation d'un radical méthyle (8062 HC) sur le noyau phényle du 8061 HC double le pouvoir antipseudoChE, mais diminue de moitié l'action anti-acétylChE.

c) sur les pseudoChE, le 8062 HC est 2,2 fois plus actif que le 8061 HC, 22,5 fois plus que le 8063 HC et 80 fois plus que le 8014; par contre, il l'est 166 fois moins que le Para-oxon et 1250 fois moins que le TEPP. Par ordre d'activité décroissante, on peut écrire:

8062 HC > 8061 HC > 8063 HC > 8014 HC

d) sur les acétylChE, le 8063 HC est 1,6 fois plus actif que le 8061 HC, 3,5 fois plus que le 8062 HC et 82 fois plus que le 8014 HC; par contre, il l'est 26 fois moins que le Para-oxon et

68 fois moins que le TEPP. On obtient, par ordre d'activité décroissante,

8063 HC > 8061 HC > 8062 HC > 8014 HC

C – DÉTERMINATION DU POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VIVO* PAR LA MÉTHODE DE MICHEL.

En raison de certaines réactions d'activation métabolique que subissent certains dérivés thionophosphates, il aurait été intéressant de pouvoir déterminer, pour chacun d'eux, leur pouvoir antiChE *in vivo*. Cependant, étant donné le nombre des produits à étudier, la détermination de l'action inhibitrice *in vivo* de tous les dérivés aurait nécessité un important travail, difficilement compatible avec les autres recherches dont nous avions prévu la réalisation. C'est pourquoi le pouvoir inhibiteur *in vivo* n'a été déterminé qu'avec un seul produit, faisant d'ailleurs partie du groupe des thiolophosphates, le 8061 HC. Les expériences ont été réalisées sur le sang (plasma et hématies) du Lapin.

Nous décrivons brièvement la technique dont nous nous sommes servi et qui fut mise au point par TILLEMENT et DEGRELLE [1964]. Dans une autre partie de ce travail (pages 57 et 112), les résultats obtenus et inscrits dans le Tableau VII seront comparés aux effets toxiques et neuromusculaires qu'entraîne l'administration de ce produit chez le Lapin.

1) Mode opératoire.

Nous avons utilisé trois lapins mâles, d'un poids compris entre 2,5 et 2,7 kg. L'animal est anesthésié par injection, dans l'une des veines marginales de l'oreille, d'un mélange de mébubarbital (18 mg/kg) et de chloralose (80 mg/kg) ; il est alors soumis à la respiration artificielle puis hépariné (2,500 U.I. d'héparine). Aux temps 0, 60 et 120 minutes, on injecte, dans la veine jugulaire externe, respectivement 5, 10 et 20 mg/kg de 8061 HC solubilisé dans 0,1 ml d'éthanol à 95° (1). Au temps moins 10 minutes, de même que 3, 30 et 55 minutes après chaque injection, on prélève 2 ml de sang qu'on centrifuge à 2,000 tours par minute pendant dix minutes. On sépare plasma et hématies, puis on lave les globules rouges à trois reprises avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100.

a) détermination du pouvoir cholinestérasique du plasma: dans un tube conique, on introduit:

– 0,5 ml de plasma,

– 2,0 ml de tampon de MICHEL pour pseudoChE.

(1) L'emploi de l'éthanol comme solvant est discuté à la page 95

Lorsque la température du mélange atteint 25°C, on ajoute au temps moins 2 minutes, 1 ml d'une solution d'acétylcholine à 1 p. 100. Aux temps 0 et 45 minutes, on mesure le *p*H.

b) détermination du pouvoir cholinestérasique des hématies: dans un tube conique, on introduit:

– 0,5 ml du culot de centrifugation,

– 0,5 ml de solution de saponine à 0,01 p. 100.

On agite jusqu'à hémolyse complète, puis on ajoute:

– 1,0 ml de solution de chlorure de potassium à 4,2 p. 100,

– 1,0 ml de solution d'acétylcholine à 0,5 p. 100.

On note le *p*H aux temps 0 et 45 minutes.

2) Résultats expérimentaux.

a) un seul dosage de l'activité pseudocholinestérasique du plasma a pu être réalisé, car seul le lapin A, après une dose de 5 mg/kg de 8061 HC, nous a fourni un plasma ne présentant aucune trace d'hémolyse. L'inhibition des pseudoChE fut alors de 29 p. 100. Dans tous les autres cas, étant donné le degré d'hémolyse -proportionnelle à la dose injectée et atteignant un maximum lors du prélèvement effectué trois minutes après l'injection- les déterminations du pouvoir antipseudocholinestérasique du plasma ont été irréalisables.

b) Chez les 3 lapins, l'inhibition de l'activité acétylcholinestérasique des hématies par le 8061 HC est indiquée dans le Tableau VII.

	Inhibition en p. 100 des AChE		
Dose	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
Lapin A	9	22	35
Lapin B	10	33	33
Lapin C	12	21	39

Tableau VII: *Pourcentage d'inhibition* in vivo *des acétylcholinestérases des hématies de Lapin par le 8061 HC.*

DEUXIÈME PARTIE

ESSAIS DE TOXICITÉ

A – GÉNÉRALITÉS.
1) Facteurs influençant la toxicité des organophosphorés.
2) Relations entre la structure chimique et la toxicité des dérivés organophosphorés.

B – PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.
1) Espèce animale.
2) Mise en solution et voie d'administration.
3) Mode opératoire.
4) Conditions de milieu.

C – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.
1) Signes d'intoxication chez la Souris par les organophosphorés de la série étudiée.
2) Etalement des effets toxiques du 7900 HC et du 7901 HC.

D – ESSAI D'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. RELATIONS STRUCTURE–TOXICITÉ.
1) Influence des formes thiono et thiolo.
2) Influence du radical R.

E – RELATIONS ENTRE TOXICITÉ ET POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VITRO*

F – INTOXICATION AIGUE PAR LE 8061 HC CHEZ LE LAPIN NON ANESTHÉSIÉ.
1) Généralités.
2) Protocole expérimental.
3) Résultats expérimentaux.

G – RAPPORTS ENTRE TOXICITÉ ET POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VIVO*.
1) Résultats expérimentaux.
2) Essai d'interprétation des résultats.

H – ESSAIS DE RÉENDORMISSEMENT PAR LE 7900 HC APRÈS SOMMEIL PAR L'HEXOBARBITAL.
1) Protocole expérimental.
2) Résultats expérimentaux.

A – GÉNÉRALITÉS

Pour apprécier la toxicité d'une substance, on détermine généralement la dose de cette substance capable de provoquer dans un lot d'animaux une mortalité de 50 p. 100; c'est la dose létale 50 (D.L. 50). Elle n'est qu'un guide, mais elle permet la comparaison de molécules voisines, dans la mesure où les conditions expérimentales sont identiques; en effet, plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier les propriétés toxiques. Citons parmi ceux-ci (CHEYMOL et coll. [1961]):

– le milieu extérieur: température ambiante, saison.

– le produit: concentration du produit dans le solvant utilisé, *p*H de la solution.

– les voies d'administration et les modalités d'injection.

– les animaux eux-mêmes: l'espèce, la souche dans une même espèce (J. CHEYMOL et coll. [1964 d]), le sexe, le nombre de lots, la durée d'observation, les conditions dans lesquelles les animaux sont maintenus avant et après l'administration du produit.

Il importera donc de toujours préciser les conditions dans lesquelles la DL 50 a été déterminée. Si ces considérations ont leur importance dans tous les cas, elles l'ont encore davantage avec les esters organophosphorés. En effet, pour plusieurs d'entre eux, il est difficile de trouver dans la littérature des résultats concordants, bien que les expérimenteurs aient employé un protocole expérimental très voisin pour ne pas dire identique.

1) Facteurs influençant la toxicité des organophosphorés. (HOLMSTEDT [1959]) (KOELLE [1963]).

Parmi les facteurs particuliers qui exercent manifestement une influence, les plus importants sont les suivants:

a) la vitesse d'hydrolyse du composé dans le solvant utilisé: le TEPP, en solution aqueuse, perd 50 p. 100 de son activité antiChE en huit heures.

b) la solubilité de l'ester dans les lipides.

c) le taux et la vitesse d'absorption, de détoxication et d'excrétion de l'organophosphoré.

d) la vitesse de réaction avec les cholinestérases.

e) la pureté du produit: les impuretés peuvent être elles-mêmes de puissants inhibiteurs comme c'est le cas lorsqu'un dérivé thiono contient des traces du dérivé thiolo correspondant (Tableau VI).

f) la voie d'administration (Tableau VI.)

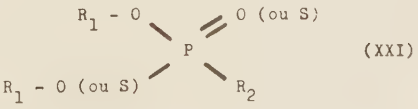
g) L'espèce animale: elle a une très grande influence sur les résultats; en effet, les systèmes enzymatiques intervenant dans les transformations métabolique de la molécule sont variables d'une espèce à l'autre (Tableau VI).

h) la souche: dans la littérature, nous n'avons pas de relevé de publications traitant de l'influence de la souche sur la toxicité des organophosphorés. Cependant, des travaux réalisés par J. CHEYMOL et coll [1964d] et portant sur la "Toxicité comparée de la strychnine et de la procaine sur diverses souches de Souris" démontrent que la souche influence nettement la valeur de la DL 50. Ainsi, la DL 50 de la strychnine, calculée selon la méthode de LITCHFIELD et WILCOXON [1949] et exprimée en $\mu g/Kg$, est respectivement de 485, 585 et 647 pour les souches C3H/He, SWISS et XL II (ces souches proviennent du Centre de Sélection de Gif-sur-Yvette).

i) le sexe: les variations liées au sexe sont très significatives; des résultats du simple au double, voire au triple, sont souvent obtenus, selon que l'on utilise des animaux mâles ou femelles. A l'intérieur d'une même espèce, les processus de détoxication semblent donc être différents d'un sexe à l'autre, les femelles étant en général beaucoup plus sensibles que les mâles (Tableau VI).

j) la stabilité du composé et sa bio-transformation: lorsqu'un organophosphoré est toxique *in vivo* et inactif comme agent antiChE *in vitro*, son activité est nécessairement dûe à un métabolite. Les réactions métaboliques peuvent engendrer des produits dont la toxicité et l'activité sont soit supérieures -le métabolite du Parathion est le Para-oxon (Tableau VI)- soit inférieures à la substance initiale.

k) la nature du solvant (Tableau VI).



(XXI)

2) Relations structure-toxicité des dérivés organophosphorés (KOELLE [1963]) (NEGHERBON [1959]).

La toxicité des organophosphorés est fonction des radicaux substitués sur l'acide phosphorique ou thiophosphorique (Formule XXI).

—influence du radical R_1: la toxicité est proportionnelle à la longueur du radical alcoyle et atteint un maximum avec l'isopropyle. Dans la série du Parathion par exemple, les composés présentant une chaine éthyle sont 2 à 3 fois plus toxiques pour le Rat et la Souris que les dérivés méthylés correspondants. Cependant, l'action insecticide n'est pas toujours proportionnelle

Produit	Degré de pureté	Solvant	Espèce	Sexe	Voie d'administration	DL 50 mg/Kg
Malathion	65 %	a	rats	mâle	orale	300
"	90 %	a	rats	mâle	orale	940
"	"	b	rats	mâle	orale	390
"	"	b	souris	mâle	orale	720
"	99 %	b	souris	mâle	orale	2700
"	"	c	souris	mâle	orale	3300
"	"	c	rats	mâle	orale	4700
Parathion	-	-	rats	mâle	orale	15
"	-	-	rats	femelle	orale	6
"	-	-	rats	mâle	i/p	7
"	-	-	rats	femelle	i/p	4
Parathion	-	d	souris	mâle	s.c.	10-12 D.M.L.
Para-oxon	-	d	souris	mâle	s.c.	0,7 D.M.L.

Tableau VIII: *Influence de différents facteurs sur la toxicité de quelques organophosphorés* (KOELLE [1963]) (NEGHERBON [1959])

a: propylène glycol b: huile végétale
c: produit injecté tel quel, sans l'aide de solvant
d: mélange d'eau et d'éthylène glycol

à l'action toxique chez les mammifères. Ainsi, les esters organophosphorés dans lesquels R_1 est un méthyle ont, pour les mammifères, une toxicité beaucoup plus faible que les dérivés éthylés correspondants; par contre, chez l'insecte, cette différence est beaucoup moins marquée, d'où l'intérêt de tels insecticides peu toxiques pour l'Homme.

—influence du radical R_2:

a) les esters d'acides phosphoriques

i) relativement forts sont en général très toxiques. (diéthylfluorophosphate).

ii) faibles sont peu toxiques (diéthylphénylphosphate).

b) les esters d'acide dithiophosphoriques présentent en général pour les mammifères une toxicité supérieure à celle du Parathion. Il y a cependant deux exceptions: le Malathion (8059 HC) et le Diméthoate (8014 bis HC) sont en effet des in-

secticides efficaces, très peu toxiques pour les mammifères parce que rapidement hydrolysés dans leur organisme.

c) les alcoyloxy sont, dans la plupart des cas, plus toxiques que leurs analogues aryloxy, mais le Para-oxon fait exception.

—substitution du soufre à l'oxygène: les thionophosphates $[(R_1\text{-}0)_2\ R_2\text{-}P=S]$ sont moins toxiques que les thiolophosphates $[(R_1\text{-}0)\ (R_1S)\ R_2\text{-}P=0]$, tant pour les mammifères que pour les insectes: leur latence est également plus grande. Ces différences sont liées au fait que les premiers nécessitent une transformation métabolique avant d'exercer leur action. Il semble en outre que les thiolos ne soient pas inactivés par la phosphoryl-phosphatase.

B – PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

L'étude de la toxicité aiguë a été effectuée en nous conformant aux conditions expérimentales données par J. Cheymol et coll. [1961]. Ces expériences furent réalisées pendant les mois d'Octobre et Novembre 1962 ainsi qu'en Janvier et Février 1963.

1) Espèce animale: nous avons utilisé 1200 souris de souche albinos Swiss, de sexe mâle et d'un poids moyen de 20 g, soit environ 100 souris par produit à étudier, TEPP et Para-oxon inclus.

2) Mise en solution et voie d'administration: nos produits étant en majorité insolubles dans l'eau, nous avons utilisé comme solvant l'huile d'olive neutralisée de la Pharmacopée française. Les concentrations des produits ont été calculées de façon telle que le volume d'huile injectée soit de 0,02 ml/g de Souris.

Nous avons utilisé, pour les produits insolubles, la voie intrapéritonéale. Pour les composés solubles dans l'eau, nous avons déterminé à la fois les toxicités par voie intrapéritonéale -dans l'huile d'olive- et intraveineuse. Dans ce dernier cas, l'injection a été pratiquée dans une des trois veines de la queue, la durée de l'injection étant fixée à 20 secondes, et le solvant utilisé étant une solution physiologique de chlorure de sodium.

3) Mode opératoire: sur des lots de 10 souris, nous avons recherché les doses provoquant 0 et 100 p. 100 de mortalité, ainsi que 2 ou 3 doses intermédiaires.

Les animaux ont été gardés en observation pendant 4 jours. Sauf dans le cas du 7900 HC et 7901 HC, dont la mortalité s'est étalée sur plus d'une semaine, toutes les morts sont survenues pendant les premières 48 heures.

numéro conventionnel H.C.	CH_3-O / CH_3-Y — P — Z / R : R	Y	Z	DL 50 i/p en mg/Kg pour Souris mâle : Behrens et Karber	Litchfield et Wilcoxon : DL 50	limites infér.	limites supér.
7900	$-O-CH_3$	O	S	1130	1070	916	1251
7901		S	O	143 i/v 120	135 i/v 115	118 i/v 92	154 i/v 144
8056	$-O-C_6H_4-NO_2$	O	S	74	72	57	91
8061		S	O	72	70	62	79
8057	$-O-C_6H_3(CH_3)-NO_2$	O	S	1030	960	815	1132
8062		S	O	156	150	127	177
8059	$-S-CH(-CH_2-COO-C_2H_5)-COO-C_2H_5$	O	S	1360	1280	1090	1500
8063		S	O	72	71	69	73
8014 bis	$-S-CH_2-CO-NH-CH_3$	O	S	199 i/v 193	191 i/v 190	165 i/v 167	222 i/v 217
8014		S	O	127 i/v 40	114 i/v 38	97 i/v 33	134 i/v 45
Paraoxon	$(C_2H_5-O)_2-P(=O)-O-C_6H_4-NO_2$			2,75	2,73	2,4	3,1
TEPP	$(C_2H_5-O)_2-P(=O)-O-P(=O)(O-C_2H_5)-O-C_2H_5$			1,18 i/v 0,32	1,20 i/v 0,32	1,15 i/v 0,31	1,32 i/v 0,34

Tableau IX: *DL 50 après 48 heures, chez la Souris, des différents dérivés thionos et thiolos, ainsi que des deux substances de référence.*

4) Conditions de milieu: avant comme après l'administration de l'organophosphoré, les souris ont eu nourriture et eau de boisson à volonté. Après l'injection, chaque lot de 10 souris a été isolé dans une cage. La température ambiante a été maintenue entre 20 et 22°C.

C – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Dans le Tableau IX, nous avons exprimé la DL 50 calculée à partir des résultats expérimentaux selon la méthode de BEHRENS et KARBER [1935] et selon celle de LITCHFIELD et WIL-

COXON [1949]. La DL 50, déterminée selon cette dernière méthode, offre l'avantage incontestable de nous donner les limites inférieures et supérieures entre lesquelles nous avons une probabilité de 95 p. 100 d'obtenir la valeur de la toxicité.

Quant au Tableau X, il permet la comparaison entre les différents composés thionos et thiols. La DL 50 de chacun de ces groupes y est exprimée par ordre de toxicité décroissante.

Le Tableau XI montre l'étalement de la toxicité du 7900 HC et du 7901 HC en fonction du temps.

Thionos: $(CH_3-O)_2P(=S)-R$			Thiols: $(CH_3-O)(CH_3-S)P(=O)-R$		
Numéro conventionnel H.C.	R	DL 50 Litchfield i/p mg/Kg	Numéro conventionnel H.C.	R	DL 50 Litchfield i/p mg/Kg
8056	-O-C$_6$H$_4$-NO$_2$	72	8061	-O-C$_6$H$_4$-NO$_2$	70
8014 bis	-S-CH$_2$-CO-NH-CH$_3$	191	8063	-S-CH(CH$_2$-COO-C$_2$H$_5$)-COO-C$_2$H$_5$	71
8057	-O-C$_6$H$_3$(CH$_3$)-NO$_2$	960	8014	-S-CH$_2$-CO-NH-CH$_3$	114
7900	-O-CH$_3$	1070	7901	-O-CH$_3$	135
8059	-S-CH(CH$_2$-COO-C$_2$H$_5$)-COO-C$_2$H$_5$	1280	8062	-O-C$_6$H$_3$(CH$_3$)-NO$_2$	150

Tableau X: *Comparaison, par ordre de toxicité décroissante, entre les thiolos et les thionophosphates.*

Numéro conventionnel H.C.	DL 50 (Litchfield) i/p en mg/Kg		
	après 48 heures	après 8 jours	après 11 jours
7900	1070	92	-
7901	135	-	8,4

Tableau XI: *Dose létale 50, en fonction du temps, des 7900 HC et 7901 HC.*

1) Signes d'intoxication chez la Souris par les organophosphorés de la série étudiée.

a) Sauf pour les 7900 HC et 7901 HC, les principales manifestations de l'intoxication que nous avons observées sont les suivantes:

– état de surexcitation, sauts, paralysie du train postérieur,
– larmoiement, sialorrhée, fasciculations, gêne respiratoire,
– convulsions cloniques, spontanées et provoquées par la moindre stimulation (bruit par exemple),
– défécation et, quelquefois, émission d'urines,
– mort par asphyxie.

Les fasciculations persistent plusieurs minutes après la mort. Lorsque la dose de produit administré provoque l'apparition de la phase convulsive, la mort s'ensuit presque toujours.

b) 7900 HC: après une brève période d'agitation, survenant quelques minutes après l'injection, les souris se couchent sur le côté et présentent une respiration très ralentie. Il nous est difficile de caractériser exactement l'état des animaux ayant reçu ce produit, état intermédiaire entre la prostration et le sommeil. La durée de cet état est proportionnelle à la dose injectée et peut être de plusieurs jours. Ainsi, pour une dose de 1 g/Kg, sur 5 souris survivant le quatrième jour après l'injection, 2 sont encore dans cet état.

c) 7901 HC: après administration du produit, les animaux présentent des manifestations d'intoxication très voisines de celles du 7900 HC. Elles gardent les yeux fermés pendant plusieurs jours; certaines ont la partie antérieure de la tête boursoufflée.

2) Etalement des effets toxiques du 7900 HC et 7901 HC.

La manifestation de l'action toxique de ces composés s'étale sur plus d'une semaine. Pour les fortes doses, la mort survient pendant les premières 48 heures, alors qu'aux doses plus faibles, l'étalement de la mortalité peut se faire sur plusieurs jours. Comme le montre le Tableau XI, le rapport entre la DL 50 après 48 heures et 8 jours est de 1 à 12 dans le cas du 7900 HC, alors que pour le 7901 HC, il est de 1 à 16 après 2 et 11 jours.

On pourrait cependant se demander si cette mortalité étalée sur plusieurs jours ne résulterait pas d'une déficience d'apport hydrique et alimentaire, résultant de l'état d'endormissement prolongé des animaux, ou bien s'il faut y voir des actions métaboliques toxiques à progression lente. La surveillance prolongée des animaux injectés s'impose.

D – ESSAI D'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. RELATIONS STRUCTURE–TOXICITÉ.

1) Influence des formes thiono et thiolo: les Tableaux IX et X mettent en évidence que la toxicité des dérivés thiolos est toujours supérieure aux thionos correspondants. Avec les 8056 HC et 8061 HC, la différence n'est pas aussi marquée qu'avec les autres produits. Ainsi, le 7901 HC est 8 fois plus toxique que

son isomère, le 7900 HC; les 8062 HC, 8063 HC et 8014 HC sont respectivement 6, 18 et 1,3 fois plus toxiques que les isomères correspondants, les 8057 HC, 8059 HC et 8014 bis HC. Si l'on fait exception du 8056 HC, le moins toxique des thiolophosphates a une toxicité supérieure au plus toxique des dérivés thionos.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, ces différences tiennent au fait que les premiers ne nécessitent pas pour agir une transformation préalable, alors que les seconds sont soumis aux réactions enzymatiques qui entrainent soit une détoxication, soit une activation métabolique.

2) Influence du radical R: Il est difficile de déterminer les modifications de toxicité apportées à la molécule par les différents radicaux R (voir Tableau X), parce que, d'une part, ces radicaux ont une structure chimique très différente de l'un à l'autre composé et que, d'autre part, le même ordre d'activité du radical n'est pas retrouvé avec les thionos et les thiolos. Cependant, on peut dégager les deux considérations suivantes:

a) il semble que l'atome de soufre faisant partie intégrante du radical R des dithiophosphorés n'influence pas réellement la toxicité, et cela aussi bien pour les phosphorothionates que phosphorothiolates, puisque ces composés semblent répartis indifféremment dans les classifications données dans le Tableau X.

b) la fixation d'un méthyle (8057 HC et 8062 HC) sur le radical paranitrophényle des 8056 HC et 8061 HC diminue considérablement l'action toxique, de 13 fois dans le cas des thionos et de 2 dans celui des thiolos.

E – RELATIONS ENTRE TOXICITÉ ET POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VITRO*.

Avant de comparer les résultats obtenus d'une part *in vivo* (DL 50) et d'autre part *in vitro* (I_{50}), il est bon de rappeler les facteurs qui peuvent modifier, parfois profondément, ces résultats de provenances si diverses.

Nous avons décrit (page 46) ceux qui sont susceptibles d'influencer la toxicité des organophosphorés; nous avons insisté sur l'emploi d'un protocole expérimental très rigoureux, permettant ainsi d'éliminer le plus possible les causes de variabilité des résultats. Dans ces conditions, les déterminations toxicologiques d'une part et anti-enzymatiques d'autre part permettent parfois d'obtenir des parallélismes d'action: à une augmentation du pouvoir antiChE *in vitro* (I_{50}) correspond une augmentation de la toxicité. On peut cependant se demander si la vitesse de réaction entre l'enzyme et l'inhibiteur ne serait pas plus directement en relation avec la toxicité. Des travaux de TAMMELIN [1958] ont montré que des toxicités élevées se rencontrent aussi

bien avec des inhibiteurs dont la vitesse de réaction est très grande (méthylfluorophosphorylcholine) qu'avec des composés réagissant beaucoup plus lentement (dérivés de la thiocholine); si l'action toxique des premiers résulte de leur réactivité, celle des seconds tient à leur grande stabilité vis-à-vis des réactions secondaires. Il apparait donc que la valeur de I_{50}, et non la vitesse de réaction, constitue une base meilleure pour la prédiction de la toxicité.

Comment expliquer alors que la comparaison entre la DL 50 et l'I_{50} de nos produits -surtout en ce qui concerne les thiolos- ne laisse apparaitre aucun parallélisme d'action et que les résultats soient si discordants (Tableaux XII et XIII)? Il est certain que si plusieurs facteurs influencent l'action toxique d'un dérivé organophosphoré, d'autres facteurs peuvent également modifier le pourcentage d'inhibition des cholinestérases *in*

Numéro conventionnel H.C.	DL 50 (Souris) mg/kg	Inhibition 50 p.100 (I_{50}) *ug*/5 ml	
		pseudoChE	acétylChE
7900	1070	> 1000	>1000
7901	135	>1000	>1000
8056	72	>1000	>1000
8061	70	2,2	2,7
8057	960	33	190
8062	150	1	6
8059	1280	>1000	>1000
8063	71	22,5	1,7
8014 bis	191	>1000	>1000
8014	114	80	140
Paraoxon	2,7	0,006	0,065
TEPP	1,2	0,0008	0,025

Tableau XII: *Comparaison entre les valeurs de la DL 50 chez la Souris et l'inhibition 50 p. 100 des cholinestérases* in vitro.

vitro. Parmi ceux-ci, le plus important est assurément le facteur enzymatique lui-même. L'utilisation de préparations non purifiées, provenant très souvent -comme c'est le cas ici- d'espèces animales autres que celle employée pour les tests de toxicité permet difficilement d'obtenir des valeurs comparables. Dans ce cas, il devient presqu'impossible d'établir des corrélations entre I_{50} et la DL 50.

Numéro conventionnel H.C.	DL 50 (Souris) mg/kg	Inhibition 50 p.100 (I_{50}) *ug*/5 ml	
		pseudoChE	acétylChE
8061	70	2,2	2,7
8063	71	22,5	1,7
8014	114	80	140
8062	150	1	6

Tableau XIII: *Comparaison du pouvoir anticholinestérasique par rapport à un ordre de toxicité décroissante.*

F – INTOXICATION AIGUË PAR LE 8061 HC CHEZ LE LAPIN NON ANESTHESIÉ.

1) Généralités.

Plusieurs expériences d'intoxication aiguë ont été entreprises par différents chercheurs afin d'obtenir un tableau général des manifestations de l'action toxique des organophosphorés à propriétés antiChE. Nous ne discuterons brièvement ici que des résultats obtenus avec le Para-oxon.

L'administration d'une dose toxique de Para-oxon à un lapin non anesthésié fait apparaitre en quelques secondes des fasciculations musculaires et des tremblements devenant généralisés une ou deux minutes après l'injection intraveineuse. Aux doses très fortes, on remarque même l'apparition de crises convulsives. Au niveau du diaphragme, des fasciculations musculaires apparaissent, s'opposant à tout mouvement respiratoire. Le coeur continue à battre pendant quelques minutes, puis s'arrête à cause de l'asphyxie. Si l'animal est soumis à la respiration artificielle avant l'arrêt cardiaque, on observe un retour à la normale. Chez les animaux anesthésiés, les mêmes phénomènes peuvent être observés, mais aucune crise convulsive ne se manifes-

te. Les anesthésiques inhibent en effet les centres supérieurs du S.N.C. qui sont fortement stimulés par de grandes concentrations d'agents antiChE.

L'activité duodénale est très sensible à l'influence des antiChE. L'augmentation du tonus et du péristaltisme se manifeste par une défécation abondante.

2) Protocole expérimental.

La symptomatologie de l'intoxication a été réalisée avec le 8061 HC. Une dose initiale de 2,5 mg/kg -correspondant au trentième de la DL 50 i/p chez la Souris- a été choisie arbitrairement comme première dose.

A quatre lapins mâles d'un poids de 2,5 kg, non anesthésiés, la dose du produit, dissoute dans 0,1 ml d'éthanol à 95° –le solvant s'étant révélé sans action apparente– est injecté dans une des deux veines marginales de l'oreille, suivie immédiatement d'une injection d'un ml d'eau salée physiologique. Le temps d'apparition des divers symptômes est noté. D'heure en heure, on injecte une dose double de la dose précédente. Ainsi, chaque animal a reçu successivement 2,5 puis 5, 10 et 20 mg/kg de l'inhibiteur à 60 minutes d'intervalle.

3) Résultats expérimentaux.

Les manifestations de l'intoxication sont réunies dans le Tableau XIV.

Après une dose de 20 mg/kg de 8061 HC, un des lapins présentait des symptômes d'une grande sévérité. La gêne respiratoire était si intense que tout mouvement était supprimé. La mort paraissait certaine. Après deux minutes d'observation, nous avons administré à l'animal, par voie intraveineuse, une dose de 20 mg/kg de Contrathion*. Une minute après l'injection du réactivateur, l'animal redressait la tête et la respiration était redevenue normale. C'est sur la respiration que l'action du Contrathion* fut la plus spectaculaire. La sévérité et la durée de tous les autres symptômes furent cependant diminuées et, quelquefois, complètement supprimées, comme ce fut le cas pour la salivation et la défécation.

Si l'on compare les résultats obtenus chez le Lapin non anesthésié avec les manifestations toxiques du 8061 HC que nous avons observées lors de l'étude de l'action neuromusculaire de ce produit chez le Lapin anesthésié et soumis à la respiration artificielle, on peut conclure que le tableau de l'intoxication est beaucoup moins important: après un temps de latence identique à celui observé précédemment apparaissent des fasciculations musculaires accompagnées de sialorrhée, de lacrymation et, pour les fortes doses, de myosis et de défécation. Les temps nécessaires au retour à la normale sont comparables dans les deux cas.

Symptômes		Dose en mg/Kg i/v			
		2,5	5	10	20
Temps de latence (secondes)		120	30	20	20
Agitations et tremblements		+	+	+	+
Incoordination motrice		+	+	+	+
Locomotion	difficile	+			
	impossible		+	+	+
Paralysie par contracture avec extension du	train antérieur	+	+	+	+
	train postérieur		+	+	+
Chute de la tête			+	+	+
Fasciculations		+	++	+++	+++
Convulsions cloniques avec mouvements de pédalage des trains antérieur et postérieur				+	+
Salivation			+	++	+++
Mouvements de mastication				+	+
Gêne respiratoire			+	++	+++
Myosis			+	++	+++
Exophtalmie				+	++
Défécation			+	++	+++
Retour à la normale (minutes)		7	8	20	>30
Mort (sur 4 animaux)		0	0	0	1

Tableau XIV: *Symptômes de l'intoxication aiguë chez le Lapin par le 8061 HC.*

G – RAPPORTS ENTRE TOXICITÉ ET POUVOIR ANTICHOLINESTÉRASIQUE *IN VIVO*.

Parallèlement à l'étude de l'intoxication aiguë par le 8061 HC chez le Lapin non anesthésié, la détermination de l'activité cholinestérasique *in vivo* chez le Lapin anesthésié et hépariné, mais soumis aux mêmes doses de produit, nous a paru devoir être faite. Mise à part l'anesthésie, nous nous sommes placé, dans les deux cas, dans les mêmes conditions expérimentales

1) Résultats expérimentaux.

Tel que mentionné à la page 44, nous n'avons pu effectuer qu'un seul dosage des pseudocholinestérases plasmatiques; l'inhibition obtenue fut alors de 29 p. 100. Par contre, la déter-

mination de l'activité des acétylcholinestérases des hématies nous a permis, grâce à plusieurs dosages, de calculer l'inhibition des cholinestérases des globules rouges en fonction de la dose de produit administrée: elle est de

9, 10 et 12 p. 100 pour une dose de 5 mg/kg,
21, 22 et 33 p. 100 pour une dose de 10 mg/kg,
33, 35 et 39 p. 100 pour une dose de 20 mg/kg.

2) Essai d'interprétation des résultats.

Une première constatation s'impose: s'il y a proportionalité entre la sévérité des symptômes et l'inhibition des AChE des hématies, on note cependant, pour les doses toxiques, une faible inhibition enzymatique. En effet, des doses de 20 mg/kg, mortelles pour un des quatre lapins non anesthésiés, déterminent, chez les animaux anesthésiés, une inhibition inférieure à 40 p. 100. Or, on admet qu'une inhibition des ChE inférieure à 80 p. 100 ne laisse que très rarement apparaitre de graves symptômes d'intoxication. Cependant, certains faits semblent contredire ce principe (Discussion [1953]):

a) chez l'Homme, la relation qui existe entre la sévérité des symptômes lors d'une intoxication et le pouvoir cholinestérasique des hématies dépend en grande partie de la voie et de la vitesse d'administration de l'agent antiChE: ainsi, on a pu démontrer que des hommes porteurs d'un masque respiratoire, exposés à une contamination par la peau, ne manifestent des symptômes d'intoxication que lorsque l'activité des AChE est inférieure à 15 p. 100 de la valeur normale. Comparativement, de fortes doses administrées par voie orale ou intraveineuse produisent des symptômes d'une grande sévérité, mais une faible inhibition des AChE, alors que de petites doses, répétées à des intervalles de temps plus ou moins rapprochés, ne laissent apparaitre aucune manifestation d'action toxique, tandis que l'activité des AChE est considérablement diminuée.

b) alors qu'il y a peu de doutes que les composés organophosphorés peuvent engendrer une augmentation de la concentration d'ACh -ou de substances parasympathomimétiques- dans le sang, des doses létales, administrées à des animaux soumis à la respiration artificielle, sont nécessaires pour produire cet effet.

Comment concilier ces contradictions apparentes?

Etant donné notre connaissance actuelle de la transmission synaptique, il est vraisemblable que la libération locale des esters de la choline aux endroits stratégiques est, dans la pharmacodynamie de l'inhibition des ChE, un facteur beaucoup plus important que celui d'une augmentation des esters choliniques dans le sang circulant. Le pourcentage d'inhibition des ChE san-

guines ne reflète donc qu'imparfaitement le degré d'inhibition au niveau des synapses et des plaques motrices. Ce qui importe, en définitive, c'est l'inhibition *in vivo* des cholinestérases au niveau de certains sites sélectifs de la cellule (KOELLE [1957], KOELLE et KOELLE [1959], SHELLEY [1955]). En effet, selon ces auteurs, la membrane neuronale séparerait les ChE totales en:

– AChE interne: c'est l'enzyme de réserve, représentant probablement l'AChE qui vient d'être synthétisée,

– AChE externe: c'est l'enzyme fonctionnelle, probablement directement responsable de l'hydrolyse de l'ACh libérée lors de la transmission cholinergique.

La dose, les vitesses d'administration et d'absorption, de même que la facilité de pénétration de l'antiChE à travers cette membrane, sont autant de facteurs qui peuvent influencer le pourcentage d'inhibition des enzymes fonctionnelles ou de réserve. Voilà pourquoi le degré d'inactivation des AChE totales, tel qu'il est déterminé par les techniques usuelles d'homogénats, ne correspond certainement pas à l'inhibition réelle de l'AChE fonctionnelle. Le pourcentage d'inhibition *in vivo* est alors probablement supérieur à celui que l'on obtient sur des homogénats *in vitro*.

H – ESSAIS DE RÉENDORMISSEMENT PAR LE 7900 HC APRÈS SOMMEIL PAR L'HEXOBARBITAL.

Nous avons tenté de mettre en évidence par cette technique une action dépressive centrale, caractérisée par l'apparition d'un deuxième sommeil lorsqu'on injecte le 7900 HC aussitôt après un premier sommeil provoqué par l'hexobarbital.

1) Protocole expérimental.

A des lots de 10 souris mâles, d'un poids de 20 g ±2 g, on injecte, par voie intraveineuse -dans une des trois veines de la queue-, 60 mg/kg d'hexobarbital sodique. Le sommeil est instantané et la durée du sommeil de chacun des animaux du lot est notée. Au moment de chaque réveil, constaté par la réapparition du réflexe de redressement, on injecte, par voie intrapéritonéale, une certaine dose de 7900 HC. On observe, après un certain temps de latence, un second sommeil (réendormissement) dont on note également la durée. On exprime les résultats en calculant la durée moyenne du premier et du deuxième sommeil.

Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux sont placés individuellement dans des bocaux reposant sur une couverture chauffante, ce qui permet de maintenir la température de l'enceinte à 28°C.

Comme solvant, nous avons utilisé la solution physiologique de chlorure de sodium pour l'hexobarbital sodique et l'huile d'olive neutralisée de la Pharmacopée française pour le 7900 HC. Dans les deux cas, les concentrations des solutions ont été calculées de telle sorte que les injections correspondent à un volume de 0,01 ml/g de Souris.

2) Résultats expérimentaux.

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le Tableau XV, chaque valeur exprimée correspondant à la valeur moyenne obtenue pour un lot de 10 souris.

Ces résultats permettent de constater que le temps de latence et la durée du deuxième sommeil sont proportionnels à la dose de 7900 HC. Ce nouveau sommeil (réendormissement) est beaucoup plus agité que le premier (à l'hexobarbital seul). De plus, au réveil, les animaux présentent souvent des périodes d'agitation, de mouvements désordonnés, totalement absents chez les animaux ne recevant que l'hexobarbital.

Durée du sommeil après hexobarbital S_1	7900 HC dose en mg/Kg	Temps de Latence	Durée du second sommeil S_2	$\frac{S_2}{S_1}$
8'08"	400	5'11"	41'06"	5,1
14'39"	400	5'55"	40'52"	2,8
10'46"	400	6'48"	61'18"	5,6
7'49"	300	7'22"	36'34"	4,7
8'13"	300	13'30"	33'30"	4,1
11'11"	200	8'57"	14'10"	1,3
12'06"	200	4'22"	16'36"	1,4

Tableau XV: *Réendormissement des souris par le 7900 HC après un premier sommeil par l'hexobarbital.*

Aucune des doses de 7900 HC utilisées ne provoque, par elle-même, une phase de sommeil. Après administration de ce produit, les phénomènes suivants sont observés: pour des doses de:

– 200 mg/kg, les souris sont dans un état d'agitation constante. Cependant, une heure après l'injection, certaines présentent un certain état de fatigue et d'assoupissement, mais, au contact de la main, l'état d'agitation reprend.

– 300 mg/kg, les animaux perdent l'équilibre, mais aucun sommeil n'est observé.

– 400 mg/kg, on note une succession de périodes d'agitation et d'engourdissement, mais aucune phase de sommeil.
Le 7900 HC ne possédant aucune action hypnotique propre et le second sommeil (S_2) étant bien différent du premier (S_1), on peut donc admettre que l'action du 7900 HC comporte une composante dépressive centrale.

TROISIÈME PARTIE

PRÉPARATION NEUROMUSCULAIRE

CHAPITRE I

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LA TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRES ET SUR L'ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES AU NIVEAU DE LA JONCTION MYONEURALE.

INTRODUCTION

I°– TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE
- 1) Description histologique.
  - a) structure de la plaque motrice.
  - b) schémas de la plaque motrice.
- 2) Mécanisme de la transmission neuromusculaire.
  - a) transmission le long du nerf.
  - b) transmission du nerf à la plaque motrice.
  - c) transmission au niveau de la plaque motrice.
  - d) transmission de la plaque motrice à la fibre musculaire.
  - e) transmission au niveau des éléments contractiles de la fibre musculaire.

II° – RÉPARTITION DES CHOLINESTÉRASES MUSCULAIRES.

III° – ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.
- 1) Action par inhibition des cholinestérases.
  - a) inhibition des cholinestérases et influence de la fréquence de stimulation.
  - b) blocage neuromusculaire par action dite 'dépolarisante'.
  - c) lieu d'action des anticholinestérasiques.
  - d) conséquences de l'inhibition des cholinestérases sur la contraction neuromusculaire. Relations entre le pourcentage d'inhibition et l'intensité d'action.
  - e) réactivation des cholinestérases musculaires et récupération des propriétés normales du muscle.

L'étude expérimentale de curare par Claude BERNARD en 1856 est à l'origine de l'intérêt sans cesse croissant que les chercheurs, depuis plus d'un siècle, ont manifesté pour l'activité des substances chimiques au niveau de la jonction neuromusculaire et pour le mécanisme intime de la transmission entre le nerf et le muscle. Si PAL mit en évidence, dès 1900, l'action anticurare de l'ésérine, la forte action parasympathicomimétique de cet alcaloïde ne fut attribuée à son pouvoir anticholinestérasique (antiChE) qu'en 1930 par ENGELHART et LOEWI. Depuis, de nombreuses substances inhibitrices des cholinestérases (ChE) ont été découvertes. A cause de leur pouvoir inhibiteur spécifique sur l'activité de ces enzymes, ces composés devinrent de précieux outils dans la recherche du mécanisme de transmission entre le nerf et le muscle et jouèrent un rôle important dans l'élaboration de la théorie humorale (DALE [1934], DALE et coll. [1934, 1936], BROWN [1937]).

I°– TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE.

L'arrivée du potentiel d'action nerveux ou influx nerveux (phase électrique) au niveau des ramifications terminales d'une fibrille nerveuse motrice entraine la libération d'une certaine quantité d'acétylcholine (ACh), stockée dans les vésicules synaptiques. L'ACh, transmetteur neurohumoral (phase chimique), traverse la barrière synaptique et se combine avec la substance réceptrice de l'appareil sous-neural, engendrant, par dépolarisation, un potentiel de plaque motrice (ppm). Ce dernier, lorsqu'il atteint un certain seuil, donne naissance au potentiel d'action musculaire (phase électrique), directement responsable de la contraction musculaire. La repolarisation de la membrane post-synaptique est assurée grâce à la destruction enzymatique rapide de l'ACh par les ChE.

Les rôles respectifs de l'ACh (1) et de l'AChE au niveau des récepteurs sont trop bien établis pour nécessiter une justification. Aussi, nous contenterons-nous d'expliquer leur fonction respective, après avoir brièvement exposé quelques données histologiques sur la synapse neuromusculaire.

La thèse de BOURILLET [1959] fut notre principale source bibliographique, surtout pour ce qui se rapporte au mécanisme de transmission entre le nerf et le muscle, mais nous avons également consulté les articles généraux de KAYSER [1963] et KOELLE [1963].

(1) Il ne faut cependant pas nier la possibilité d'un rôle identique à d'autres dérivés choliniques ou non, agissant conjointement à l'ACh ou seuls.

1) Description histologique: structure de la plaque motrice.

La formation histologique particulière constituée d'éléments musculaires et située au niveau de l'insertion musculaire des rameaux terminaux d'une fibrille nerveuse motrice a reçu le nom de plaque motrice ou sole motrice (Figure 12).

Des recherches effectuées au moyen de méthodes histochimiques par plusieurs auteurs, dont COUTEAUX [1953,1958], COUTEAUX et TAXI [1952], ANDERSSON-CEDERGREN [1959] et ROBERTSON [1956], ont permis de déterminer les détails structuraux suivants:

à l'endroit où l'axone s'insère dans la fibre musculaire, la gaine de myéline du nerf moteur disparait. Celui-ci se ramifie pour donner une arborisation terminale de 50 à 100 μ de diamètre, serpentant dans une dépression de la membrane musculaire appelée gouttière ou sillon synaptique. Cette gouttière est creusée dans le sarcoplasme, parallèlement à l'axe de la fibre nerveuse. Au niveau de la partie terminale de l'axone, la gaine de SCHWANN se transforme, prend la forme d'un biseau et recouvre la partie supérieure de la fibrille nerveuse, servant ainsi de chapeau à la gouttière synaptique: c'est la membrane télogliale (téloglie). Contrairement à ce que l'on avait supposé, cette membrane télogliale ne s'interpose pas entre la surface inférieure de la terminaison nerveuse et les éléments musculaires de l'appareil sous-neural résultant, quant à lui, d'une modification structurale (invaginations) de la membrane superficielle sarcoplasmique. La face musculaire d'une gouttière est donc bordée de lamelles qui, en coupe, donnent un aspect palissadique. Cet appareil sous-neural est postsynaptique puisqu'il ne disparait pas après dégénérescence nerveuse (présynaptique).

Bien que les éléments nerveux et musculaires soient séparés, une certaine intimité structurale doit nécessairement exister entre les deux, ne serait-ce que pour permettre la diffusion ou le transport actif de l'ACh au niveau des récepteurs postsynaptiques: cette liaison structurale est assurée par les membranes superficielles axoplasmique et sarcoplasmique. Histologiquement, chacune d'elles est composée de trois feuillets; la membrane synaptique, résultant de l'accolement des deux membranes, est elle-même formée de cinq feuillets, par suite de l'union des deux feuillets externes (feuillet numéro 3, Figure 12C). Malgré l'accolement des deux membranes, la membrane superficielle axoplasmique n'épouse pas les invaginations membranaires sarcoplasmiques; il en résulte que le surface post-synaptique est considérablement supérieure à la surface présynaptique.

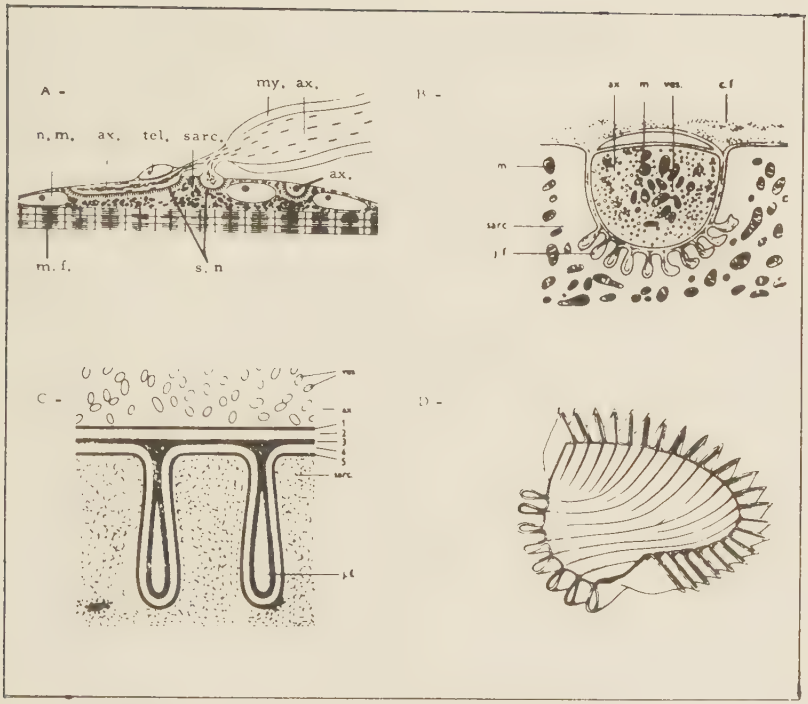


Figure 12: *Plaque motrice (d'après* COUTEAUX [1958]).

A – Vue schématique en coupe horizontale.
B – Vue schématique en coupe transversale.
C – Schéma de deux plis jonctionnels montrant les 5 feuillets de la membrane synaptique composée.
D – Représentation tridimensionnelle de l'appareil sous-neural à l'extrémité d'une gouttière synaptique.

Légende de la Figure 12:

ax : axoplasme	n.m. : noyau musculaire
c.f. : fibrilles de collagène	sarc : sarcoplasme
j.f. : pli jonctionnel	s.n. : appareil sous-neural
m : mitochondries	tel : téloglie
m.f. : myofibrilles	ves : vésicules synaptiques.
my : myéline	

Au niveau de la membrane synaptique, des pores ou canalicules facilitent les échanges entre les compartiments pré- et post-synaptiques.

Les différences de concentration des éléments figurés cellulaires -mitochondries et vésicules axoplasmiques, noyaux et mitochondries sarcoplasmiques- des régions éloignées ou proximales de la plaque révèlent que la zone synaptique neuromusculaire est le siège d'une activité fonctionnelle très intense.

2) Mécanisme de la transmission neuromusculaire.

a) transmission le long du nerf.

A l'état de repos, une fibre nerveuse est polarisée: une différence de potentiel, due à une dissymétrie ionique, existe entre l'intérieur et l'extérieur de la fibre. La face externe de la membrane est positive et la face interne est négative. Cette différence de potentiel se maintient tant qu'il n'y a pas de lésion ou passage d'un influx: c'est le potentiel de repos, aussi appelé potentiel de démarcation, de membrane ou de lésion. Tout stimulus, d'origine centrale ou périphérique -stimulus électrique appliqué le long du nerf par exemple- produit, au point de stimulation, une modification de la perméabilité membranaire. Les mouvements d'ions sodium créent une inversion de polarité, c'est-à-dire une dépolarisation: c'est le potentiel d'action nerveux qui, lorsqu'il atteint un certain seuil, peut se propager grâce aux propriétés mêmes de la fibre nerveuse. Cette onde de dépolarisation (potentiel d'action nerveux propagé) progresse le long du nerf (influx nerveux) à une vitesse proportionnelle à la grosseur de la fibre (1) et atteint les terminaisons nerveuses dans la gouttière synaptique.

b) transmission du nerf à la plaque motrice.

Entre les terminaisons nerveuses et la plaque motrice, il n'y a pas continuité structurale, mais simple contact entre les membranes axoplasmique et sarcoplasmique. Il apparaît nécessaire qu'un troisième élément joue la fonction d'agent de liaison entre les deux autres. C'est le rôle de l'acétylcholine.

Tel que discuté à la page 9, l'acétylcholine stockée dans les vésicules de l'axoplasme terminal est activée ou plus probablement libérée sous l'action d'un influx nerveux, par modification de la perméabilité ou rupture de la membrane vésiculaire.

L'ACh possède une fonction de médiateur, mais KOELLE [1961, 1962] lui attribue également un autre rôle: la fonction immédiate de l'ACh libérée aux terminaisons présynaptiques serait une fonction d'autolibération, c'est-à-dire qu'elle exciterait les terminaisons présynaptiques à libérer une quantité additionnelle

(1) Cette vitesse est comprise entre 25 et 65 mètres par seconde.

d'ACh, facilitant par le fait même la transmission à travers les canalicules synaptiques. L'ACh traverse alors la membrane, arrive au niveau de l'appareil sous-neural et agit sur les récepteurs de la plaque motrice.

c) transmission au niveau de la plaque motrice.

"La plaque est une portion de la substance musculaire différenciée au point de vue anatomique, fonctionnel et pharmacologique, mais sa spécificité est d'ordre chimique" (BOURILLET [1959]). LANGLEY considérait déjà en 1905 la substance réceptrice comme constituée des molécules de la membrane post-synaptique. D'ailleurs, la réactivité particulière de la plaque motrice pour les composés cationiques en général et pour l'ACh en particulier (1) ne fait qu'apporter une preuve supplémentaire de l'existence d'une structure ou d'une substance particulière, réceptrice du transmetteur chimique.

L'ACh, après diffusion ou transport actif à travers les pores synaptiques, se fixe sur la substance réceptrice. La combinaison qui en résulte fait passer la membrane post-synaptique d'un état de repos à un état d'excitation, caractérisée par une forte diminution de la résistance membranaire et une augmentation de la perméabilité à tous les ions. La disparition de la polarisation normale de la plaque entraine une dépolarisation locale, donnant ainsi naissance au potentiel de plaque motrice (ppm). Pendant toute la durée de ce ppm (temps nécessaire à l'hydrolyse des molécules d'ACh par les ChE et à la repolarisation), la plaque demeure réfractaire à une nouvelle action dépolarisante de l'ACh mais retrouve ses propriétés normales au repos.

Si, à l'état de repos, le potentiel de membrane d'une fibre musculaire est stable, celui de la plaque motrice ne l'est pas. En effet, toutes les secondes environ, on peut enregistrer des variation de potentiel, de forme et de durée semblables au ppm, mais d'une amplitude bien inférieure. Le curare diminue l'amplitude de ces potentiels, la dégénérescence nerveuse les supprime, mais les antiChE les augmentent en amplitude et en durée. Ces potentiels sont produits par la libération spontanée et intermittente de quantités d'ACh nettement insuffisantes pour déclenclencher un potentiel de plaque complet. On les appelle potentiels miniatures de plaque motrice.

En raison de la constance de l'amplitude (2) des potentiels miniatures, même sous l'influence de facteurs modifiant pro-

(1) La sensibilité de la plaque motrice à l'ACh est 1.000 fois supérieure à celle de toute autre région membranaire de la fibre musculaire.

(2) Pour une fibrille nerveuse motrice, l'amplitude des potentiels miniatures est constante; cependant, elle est proportionnelle au diamètre de cette fibrille nerveuse.

fondément leur fréquence d'apparition (pression osmotique, variations de la polarisation membranaire...), on croit que ces potentiels sont produits par la libération d'une quantité constante ou quantum (1) d'ACh. Plusieurs centaines (100 à 1,000) de potentiels miniatures sont nécessaires à la formation d'un potentiel de plaque motrice. Un potentiel miniature est donc le résultat d'un seul quantum d'ACh, alors qu'un potentiel de plaque est dû à la libération simultanée d'un très grand nombre de quantums d'ACh.

d) transmission de la plaque motrice à la fibre musculaire

Lorsque les terminaisons nerveuses de l'axone libèrent un nombre suffisant de quantums d'ACh, le potentiel de plaque motrice atteint le niveau critique de dépolarisation: un potentiel de pointe se forme puis se propage à toute la fibre musculaire. C'est le potentiel d'action musculaire propagé.

Les variations de potentiels de la membrane post-synaptique modifient, par un mécanisme de nature purement électrique, l'excitabilité des autres régions de l'aire post-synaptique. La dépolarisation de la membrane produit un "creux" électrique, entrainant la formation de courants convergents à partir des régions voisines (extrasynaptiques) où la polarisation est normale. Ces courants sont cependant locaux et produisent des variations de potentiels électrotoniques -caractérisés par le fait que le potentiel membranaire atteint assez rapidement un niveau stable- d'intensité décroissante à mesure que l'on s'éloigne de la région synaptique. Ces synapses excitatrices créent ainsi un catélectrotonus -polarisation négative- au niveau des régions extrasynaptiques membranaires. Lorsque ces dépolarisations atteignent une valeur suffisante (valeur critique ou seuil), un potentiel de pointe se forme et se propage à toute la structure extrasynaptique.

e) transmission au niveau des éléments contractiles de la fibre musculaire.

La membrane de la fibre musculaire maintient, à l'état de repos, une différence de potentiel d'environ 100 millivolts. La propagation du potentiel d'action jusqu'aux extrémités de la fibre s'effectue d'une manière analogue à la conduction nerveuse. La fibre répond donc à la loi du tout ou rien. La vitesse de propagation de l'influx est de quatre à cinq mètres par seconde chez l'Homme. A cause de la position centrale de la plaque motrice et de la lenteur relative du phénomène de contraction, cette vitesse est suffisante pour permettre une activation presqu'instantanée de l'ensemble de la fibre. Le potentiel d'action propagé est suivi d'une période réfractaire de deux à cinq millisecondes.

(1) Un quantum correspondrait à environ 10,000 molécules d'acétylcholine.

La vitesse de diffusion des ions vers le centre de la fibre est un phénomène beaucoup trop lent pour expliquer le bref temps de latence entre la dépolarisation membranaire et la contraction de la fibre. Un processus autre que celui de la simple diffusion est nécessaire pour expliquer la propagation de l'excitation vers l'intérieur de la fibre. Il semble que ce soit là le rôle des tubules du réticulum sarcoplasmique, nombreux dans toute fibre musculaire puisque situés perpendiculairement à l'axe de la fibre tous les deux ou trois μ chez le muscle au repos. La dépolarisation, issue de la plaque motrice, parcourt la membrane puis descendrait électrotoniquement vers l'intérieur de la fibre par ces tubules, entrainant la libération d'ions calcium stockés dans de petites vésicules de la membrane tubulaire. Le rôle des ions calcium serait alors d'inhiber momentanément une substance dite "de relâchement", fixée aux filaments d'actine et de myosine. Cette inhibition permettrait la formation du complexe d'actomyosine, c'est-à-dire la contraction de la fibre. L'énergie nécessaire à la contraction est fournie par l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase. Cependant, une partie de cette énergie servirait à la réabsorption des ions calcium par les vésicules des membranes tubulaires. Celle-ci se ferait par transport actif et permettrait à la substance "de relâchement" de jouer à nouveau son action inhibitrice sur le complexe d'actomyosine, entrainant ainsi la relaxation de la fibre.

Selon HUXLEY et HANSON [1960], la contraction n'est pas due à un raccourcissement des filaments d'actine et de myosine; le changement de la longueur du muscle résulte au contraire d'un glissement l'un sur l'autre des deux filaments de longueur invariable.

II°– RÉPARTITION DES CHOLINESTÉRASES MUSCULAIRES.

Si l'élimination de l'ACh au niveau de la plaque motrice n'était assurée que par le phénomène de diffusion vers des régions extrasynaptiques, des perturbations importantes de la transmission seraient inévitables lors d'une activité musculaire intense. Voilà pourquoi il est indispensable que la fibre musculaire, spécialement au niveau de la plaque motrice, soit douée d'un mécanisme d'inactivation rapide de l'ACh libérée par les terminaisons nerveuses; c'est le rôle des cholinestérases qui assurent sa destruction.

D'après les vitesses d'hydrolyse de la benzoylcholine et de l'acétyl–β–méthylcholine par des homogénats de tissus musculaires de Rat, ORD et THOMPSON [1950] ont montré que l'AChE était la principale enzyme à action cholinestérasique du muscle

strié puisqu'elle correspondait à environ 95 p. 100 des ChE musculaires totales, la butyrylcholinestérase (BuChE) n'en représentant qu'environ 5 p. 100.

Quant à leur localisation, MARNAY et NACHMANSOHN [1938] ont montré que l'AChE des muscles striés était localisée dans les régions terminales des nerfs moteurs. Ces auteurs estimèrent que l'activité cholinestérasique dans la zone de plaque était de 15,000 à 30,000 fois supérieure à celle du tissu musculaire environnant. Ces faits ont été vérifiés par des méthodes histochimiques et ultramicro-analytiques par plusieurs auteurs, comme nous le verrons ci-après.

KOELLE [1950] et DENZ [1953], par des méthodes histochimiques, ont confirmé que l'enzyme à propriété cholinestérasique correspondait surtout à l'AChE et qu'elle était située au niveau de la jonction neuromusculaire. Cependant, par des déterminations d'activité sur le diaphragme de Rat, DENZ [1953] a également mis en évidence la présence de faibles quantités de BuChE.

GIACOBINI et HOLMSTEDT [1960], au moyen de techniques ultramicro-analytiques, ont conclu que l'AChE était sélectivement localisée au niveau de la plaque: l'activité par unité de volume d'une seule plaque motrice, isolée par microdissection, est au moins 50 fois supérieure à celle de toute autre région de la fibre musculaire.

La plus grande concentration de l'AChE est localisée post-synaptiquement au niveau de l'appareil sous-neural, à la surface et dans les invaginations de la membrane superficielle sarcoplasmique. La différence entre les concentrations enzymatiques pré- et post-synaptiques est due, en partie, aux différences des surfaces membranaires. Cette distribution est idéale puisque l'AChE post-synaptique permet la destruction rapide des molécules d'ACh libérées par les terminaisons nerveuses et fixées sur la substance réceptrice de l'appareil sous-neural. Cette localisation fut mise en évidence par la microscopie électronique, mais elle est confirmée par les faits suivants:

– après dégénérescence nerveuse, l'activité cholinestérasique persiste.

– après inhibition des AChE par un antiChE, on constate, pour des stimulations uniques, une prolongation des potentiels de plaque motrice (ppm) et des décharges répétées de potentiels d'action musculaire.

La distance entre la membrane superficielle axoplasmique (présynaptique) et l'appareil sous-neural (post-synaptique) est tellement réduite qu'il fut pendant longtemps difficile de déterminer si on devait attribuer une action cholinestérasique aux terminaisons nerveuses de l'axone. Une série d'expériences per-

met apparemment de conclure positivement. D'après les travaux de COUTEAUX et TAXI [1952], une activité cholinestérasique peut être décelée au niveau des structures présynaptiques. Les travaux de SCHWARZACHER [1957] suggèrent que la plus grande concentration de BuChE est localisée au niveau de la membrane superficielle télogliale. Ceci confirme les résultats de KOELLE [1961, 1962] selon lesquels la BuChE est concentrée dans les cellules de la gaine de SCHWANN, alors que l'axone ne manifeste qu'une activité acétylcholinestérasique. Le rôle des ChE présynaptiques serait de prévenir une autolibération perpétuelle par les vésicules synaptiques.

Toutes ces données, obtenues grâce à des méthodes histochimiques ou ultramicro-analytiques, ont été confirmées par les quelques recherches effectuées au microscope électronique. LEHRER et ORNSTEIN [1959] ont montré en effet que l'AChE était située à deux niveaux différents de la plaque:

– dans la gouttière synaptique, entre les membranes axoplasmique et télogliale,

– entre les membranes axoplasmique et sarcoplasmique, de même que dans les invaginations de cette dernière.

Enfin, selon KOELLE [1957], une membrane à caractères lipidiques séparerait, dans les sites effecteurs, l'AChE externe ou fonctionnelle de l'AChE interne ou de réserve.

En guise de résumé, on peut attribuer à l'AChE quatre rôles principaux à la jonction neuromusculaire (VOLLE et KOELLE [1961]) :

a) limitation dans le temps de l'action médiatrice de l'ACh au niveau post-synaptique,

b) hydrolyse rapide de l'ACh, source immédiate de choline pour la resynthèse de l'ester aux terminaisons présynaptiques,

c) protection des terminaisons présynaptiques contre une auto-libération perpétuelle d'ACh,

d) prévention, à l'état de repos, de l'accumulation de concentrations activatrices d'ACh.

III° – ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES À LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE.

La réponse contractile d'un muscle strié, après stimulation du nerf moteur, est souvent utilisée comme moyen d'étude du phénomène de transmission dans une population de jonctions neuromusculaires. L'action de substances chimiques sur une telle population est observée sur la contraction musculaire, à la condition que ces substances n'altèrent pas la conduction dans l'axone et dans les fibres musculaires ni ne modifient le méca-

nisme contractile. De tels composés agissent donc au niveau de la plaque elle-même,

– soit en se fixant, par compétition, sur les récepteurs de l'ACh (*d*-tubocurarine),

– soit en potentialisant l'action de l'acétylcholine:

– par action parasympathicomimétique directe (succinyldicholine)

– par action parasympathicomimétique indirecte, c'est-à-dire par inhibition des cholinestérases (les antiChE en général et les organophosphorés en particulier).

En raison des divers sites d'action possible au niveau de la jonction neuromusculaire pour une substance chimique (action au niveau du nerf moteur, de la plaque motrice ou de la fibre musculaire, action sur la transmission nerf-plaque ou plaque-fibre), nous décrirons brièvement le lieu et le mécanisme d'action des antiChE de même que leurs principaux effets au niveau musculaire. Cependant, avant d'entreprendre cette étude, il nous paraît utile de définir ce que l'on entend par stimulation directe ou indirecte d'un muscle, de même que le sens que nous donnons aux termes potentialisation des contractions.

– stimulation directe du muscle: l'excitation est appliquée directement sur la masse musculaire par l'intermédiaire d'électrodes introduites dans le muscle lui-même. Dans certains cas, la stimulation s'effectue sur une préparation curarisée afin de bloquer les jonctions myoneurales et éviter ainsi l'excitation des terminaisons nerveuses (c'est-à-dire une excitation indirecte) par diffusion de la stimulation directe.

– stimulation indirecte du muscle: l'excitation est portée sur le nerf par l'intermédiaire d'électrodes déposées de telle sorte que le pôle négatif est orienté vers la périphérie (vers le muscle) et le pôle positif vers les centres.

– potentialisation des contractions maximales: par ces termes, nous entendons une augmentation de l'amplitude des contractions musculaires par rapport aux contractions d'amplitude normale obtenues à l'aide de stimulus supramaximaux uniques (mettant en jeu toutes les unités motrices musculaires) appliqués sur le nerf. Nous savons que le terme potentialisation est généralement utilisé dans le sens d'une augmentation de l'effet d'une substance par une autre; cependant, si on accepte que le transmetteur chimique au niveau de la plaque est l'ACh et que les antiChE, en bloquant le pouvoir hydrolytique des ChE, facilitent et augmentent les actions de l'ACh en potentialisant ses effets, nous croyons que l'emploi de ce terme est justifié.

1) Action par inhibition des ChE.

Nous avons décrit, à la page 55, les divers symptômes de

l'intoxication aiguë chez le Lapin non anesthésié, après administration de doses toxiques d'antiChE. Parmi ceux-ci, rappelons les fasciculations musculaires et la paralysie respiratoire. Ces différentes manifestations résultent de l'action des organophosphorés à la jonction myoneurale et, plus spécifiquement, de leur action inhibitrice sur les ChE par phosphorylation du centre actif de l'enzyme (BURGEN [1949], WILSON et BERGMANN [1950]). Ces faits confirment l'hypothèse faite à partir de la découverte de la puissante action antiChE de l'ésérine, et selon laquelle la potentialisation des contractions résulte de l'accumulation d'ACh au niveau de la plaque. L'électrophysiologie permet de démontrer que la prolongation du potentiel de plaque motrice (ppm) est étroitement liée à l'inhibition des ChE.

a) inhibition des ChE et influence de la fréquence de stimulation.

La conséquence immédiate de l'inhibition enzymatique est la suivante: l'action de l'ACh, normalement brève, devient persistante. Selon l'activité nerveuse, on obtient les phénomènes suivants:

– à basse fréquence de stimulation (<60 stimulus par minute):

après une inhibition importante des ChE, la libération d'une quantité physiologiquement active d'ACh au niveau présynaptique se manifeste macroscopiquement comme une secousse tétanique ou comme une potentialisation des contractions. Ceci résulte d'une action prolongée de l'ACh à la jonction myoneurale, mais la faible activité cholinestérasique résiduelle et la diffusion de l'ACh en dehors de la synapse assurent sa destruction et son élimination.

– à haute fréquence de stimulation (fréquence tétanique):

le nombre de quantums d'ACh libérée est si élevé et l'intervalle entre leur libération est si bref que la faible activité enzymatique résiduelle et la diffusion extrasynaptique sont nettement insuffisantes pour la destruction et l'élimination de l'ACh. L'accumulation du transmetteur qui en résulte entraine un blocage neuromusculaire.

b) blocage neuromusculaire par action dite "dépolarisante".

Parce que les antiChE produisent un blocage par accumulation d'ACh, on peut considérer qu'ils appartiennent au groupe des substances dépolarisantes, représentées par le décaméthonium et la succinyldicholine; ils diffèrent de la *d*-tubocurarine ou du tri-iodo-éthylate de gallamine dont le blocage s'effectue par compétition avec les molécules d'ACh. Contrairement à ce que l'on croyait, la dépolarisation ne persiste pas pendant toute la durée de la paralysie, mais, après une dépolarisation initiale, la

membrane se repolarise, tandis que le blocage myoneural se poursuit (THESLEFF [1960]). Ainsi, le changement local de potentiel sous l'influence d'une forte dose d'ACh diminue graduellement malgré la persistance, au niveau de la plaque, d'une forte concentration acétylcholinique: les récepteurs deviennent réfractaires aux substances dépolarisantes. Pendant la durée de cet état réfractaire, toute augmentation de la concentration d'ACh ou de substances dépolarisantes est inefficace et ne fait qu'intensifier le blocage neuromusculaire. L'élimination de l'agent chimique est suivie d'une récupération complète de la sensibilité de la plaque.

Il faut cependant s'abstenir d'attribuer à la seule accumulation d'ACh (c'est-à-dire à la seule action antiChE) le blocage neuromusculaire; comme nous le verrons plus loin (page 79), plusieurs faits suggèrent la possibilité d'actions propres des organophosphorés au niveau des récepteurs.

c) lieu d'action des anticholinestérasiques.

En raison de la proximité des ChE pré- et post-synaptiques, il est évident que l'action inhibitrice se manifeste aux deux endroits. Cependant, il n'y a peut-être pas proportionnalité entre la faible concentration enzymatique présynaptique (5 p. 100) et les effets dûs à leur inhibition. Mais, vu la forte concentration d'AChE (95 p. 100) de l'appareil sous-neural, on doit admettre que les antiChE agissent surtout à ce niveau. D'ailleurs, leur action antagoniste des curarimimétiques (*d*-tubocurarine, gallamine. . .) est considérée comme une action au niveau de la plaque: l'équilibre compétitif aux récepteurs étant régi par la loi d'action de masse, toute substance (antiChE par exemple) qui favorise une accumulation ou une augmentation de la concentration d'ACh déplace indirectement ces curarimimétiques des récepteurs et restaure la contraction musculaire normale.

d) conséquences de l'inhibition des cholinestérases sur la contraction musculaire. Relations entre le pourcentage d'inhibition et l'intensité d'action.

L'étude de l'action d'un composé à la jonction neuromusculaire peut être réalisée par l'enregistrement des contractions isotoniques: une modification d'amplitude résulte d'une action au niveau de la fibre musculaire ou des terminaisons nerveuses de la plaque; la localisation exacte de l'action est facilement déterminable par actions comparées ou par interactions avec des substances chimiques dont le mécanisme d'action est connu. Sachant que les organophosphorés agissent au niveau de la plaque en inhibant les ChE, nous décrirons maintenant les manifestations de cette inhibition enzymatique sur la contraction. A cause de l'influence de la fréquence de stimulation, nous diviserons ce

bref exposé en deux parties: conséquences de l'inhibition des ChE
- à basse fréquence de stimulation (<60 stimulus par minute),
- à haute fréquence de stimulation (fréquence tétanique).

Les résultats d'expériences *in vitro* proviennent d'études réalisées sur la préparation nerf phrénique – muscle diaphragme isolés de Rat, tandis que la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Chat ou de Lapin a ordinairement servi aux déterminations d'actions qualitatives *in vivo*.

∝) basse fréquence de stimulation: les organophosphorés, tant *in vitro* (Van Der Meer et Meeter [1956], Barnes et Duff [1953]) qu'*in vivo* (Brown et coll. [1947], Hunt (1947], Olive [1962]) potentialisent les secousses musculaires isométriques ou les contractions isotoniques. Cette potentialisation apparait macroscopiquement comme une contraction tétanique à un seul influx nerveux et se développe lentement. Elle est généralement accompagnée de secousses spontanées, absentes chez des muscles énervés stimulés directement. Ces fasciculations s'expliquent de la façon suivante: à l'état de repos, il existe des potentiels miniatures de plaque motrice dont l'amplitude est inférieure à la valeur critique ou seuil. L'inhibition des ChE augmente la fréquence et l'amplitude de ces potentiels miniatures. L'association de ces deux facteurs explique l'apparition de potentiels d'action propagés et la contraction de fibres musculaires individuelles (fibrillations), visible macroscopiquement comme des contractions de groupes de fibres (fasciculations).

Barnes et Duff [1953], sur la préparation nerf phrénique - diaphragme de Rat, ont montré que les réponses musculaires passent par des phases successives, chacune d'elles correspondant à un pourcentage différent d'inhibition enzymatique. Si on ajoute au bain du Para-oxon (pour une concentration finale de 4×10^{-7} M), après une période de latence d'environ deux minutes apparait un début de potentialisation des contractions. Cette augmentation d'amplitude se continue pendant trois ou quatre minutes. On note également la présence de fasciculations. Dix minutes après l'addition de l'inhibiteur, les contractions reviennent à leur amplitude normale, même si l'inhibiteur est laissé en contact avec la préparation pendant plusieurs heures.

Quel rapport existe-t-il entre l'apparition des diverses phases de contractions et l'inhibition enzymatique? La potentialisation et les fasciculations musculaires apparaissent lorsque l'activité des ChE est réduite de 50 p. 100, persistent jusqu'à une inhibition de 90 p. 100 puis disparaissent, malgré la suppression presque totale du pouvoir cholinestérasique. On aurait pu supposer qu'à partir d'un certain pourcentage d'inhibition, l'accumulation d'ACh entrainerait un blocage par dépolarisation et une

suppression totale des contractions en réponse à des stimulus uniques. Cependant, ces auteurs ne purent obtenir semblables résultats.

D'après les expériences de VAN DER MEER et MEETER [1956], réalisées sur le diaphragme de Rat, le début de la potentialisation, après traitement au DFP, s'observe lorsque les ChE musculaires sont inhibées de 20 p. 100, puis les contractions reviennent à leur amplitude normale, malgré une inhibition complète ou presque.

Quant à BARSTAD [1960], ses travaux montrent qu'un début de potentialisation survient pour une inhibition d'environ 65 p. 100 et qu'elle est maximale lorsque 90 p. 100 de l'activité enzymatique est supprimée.

D'après ces résultats et d'autres encore, obtenus *in vivo* (intoxication aiguë chez le Lapin par exemple: pages 55 et 56), il semble que les actions musculaires surviennent pendant la période d'inhibition enzymatique elle-même, mais qu'une fois le maximum d'inhibition atteint, l'organe ou l'animal s'adapte à un niveau très bas d'activité cholinestérasique.

Enfin, sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat, excitée par des stimulus uniques et soumise à de très fortes concentrations d'antiChE (200 μg/ml de DFP, 0,25 μg/ml de TEPP), certains auteurs dont VAN DER MEER et MEETER [1956], BARSTAD [1956a, 1956b], BURGEN et coll. [1949] ont obtenu une diminution d'amplitude des contractions, réversible par lavage. Comme nous le verrons plus loin, cette dépression des contractions résulte peut-être aussi d'une action propre de l'inhibiteur au niveau des sites récepteurs.

BERRY et EVANS [1951], à la suite de tels résultats, ont proposé deux alternatives:

– ou bien l'AChE, au niveau de la jonction myoneurale, n'est pas essentielle pour la transmission à basse fréquence de stimulation,

– ou bien une très faible activité acétylcholinestérasique, voisine de la limite de sensibilité des techniques utilisées pour la détermination de l'activité résiduelle des ChE, suffit à la transmission normale au niveau de la plaque.

β) haute fréquence de stimulation: l'incapacité du muscle de répondre par une contraction soutenue à des excitations répétées (tétaniques) par suite d'une diminution du seuil tétanique est connue sous le nom d'inhibition de WEDENSKY: le muscle ne répond qu'à la première d'une série de stimulus appliqués au nerf. C'est là un des premiers effets des antiChE à la jonction neuromusculaire. Ainsi, à l'inhibition progressive des ChE correspond une diminution parallèle de la fréquence à laquelle le muscle peut

soutenir un tétanos. Ce phénomène apparait avec la phase de potentialisation des contractions. Si, après la fréquence tétanique et l'inhibition de WEDENSKY, on revient à des excitations uniques du nerf, on note une phase dépressive transitoire sur la potentialisation des contractions.

L'inhibition de WEDENSKY s'observe sur les préparations nerf - muscle *in vitro* (Barnes et Duff [1953], Barstad [1960], Berry et Evans [1951]) et *in vivo* (Hunt [1947], Olive [1962]). Ce blocage neuromusculaire par un antiChE est, sur la préparation nerf phrénique – diaphragme de Rat, ordinairement réversible par lavage, mais devient pratiquement irréversible lorsque le temps de contact entre la préparation et l'inhibiteur est trop prolongé ou lorsque la concentration d'organophosphoré utilisée est trop grande.

Barnes et Duff [1953] ont montré que la capacité du muscle diaphragme à soutenir un tétanos disparait lorsque 90 p. 100 de l'activité normale des ChE est inhibée, ce qui fut confirmé par Barstad [1960]. Si on obtient une inhibition enzymatique complète par de fortes concentrations d'organophosphoré, le même phénomène d'inhibition de WEDENSKY se manifeste; cependant, avec une réactivation d'à peine 5 p. 100 des BuChE, celle des AChE restant nulle, le muscle récupère ses propriétés et peut soutenir à nouveau un tétanos.

Une conséquence importante de l'inhibition de WEDENSKY apparait sur la respiration, lors d'une intoxication aiguë. On sait en effet que l'action sur le centre respiratoire et les jonctions myoneurales des muscles respiratoires sont parmi les premiers effets des antiChE. A cause du blocage neuromusculaire partiel, des troubles de transmission au niveau du diaphragme produisent une dépression considérable du volume respiratoire, entrainant ainsi, dans le nerf phrénique, une augmentation de la durée et de la fréquence des décharges inspiratoires en provenance du centre respiratoire. Durant les basses fréquences d'activité nerveuse, l'accumulation de quantités suboptimales d'ACh exalte la transmission neuromusculaire; au contraire, pendant les hautes fréquences d'activité, l'accumulation de quantités paralysantes d'ACh l'inhibe. Le blocage neuromusculaire dépend donc non seulement de la dose de l'inhibiteur, mais aussi de l'activité nerveuse. En d'autres termes, plus le centre respiratoire est actif, plus les conditions sont favorables à l'inhibition de WEDENSKY. On comprend qu'un cercle vicieux peut s'installer: la défaillance respiratoire entraine une réduction de la ventilation, mais l'accumulation de gaz carbonique dans le sang stimule, à son tour, le centre respiratoire dont l'augmentation des décharges intensifie le blocage.

e) réactivation des cholinestérases musculaires et récupération des propriétés normales du muscle.

La reprise de l'activité enzymatique à la suite d'une inhibition par un antiChE et la récupération des propriétés musculaires sont le résultat d'une réactivation spontanée ou provoquée des ChE.

∝) réactivation spontanée:

– basse fréquence de stimulation: la stabilité du complexe enzyme-inhibiteur est liée à la stabilité de la liaison qui unit l'inhibiteur à l'enzyme. Cette liaison est elle-même dépendante des radicaux R du groupement phosphorylé. D'ailleurs, des travaux de BARNES et DUFF [1953], BARSTAD [1960] le confirment:

* si R est un méthyle (méthylpara-oxon, diméthoxyfluorophosphate), la liaison est faible et la potentialisation des contractions est reproductible après lavage.

* si R est un éthyle (TEPP, Para-oxon, diéthylfluorophosphate) ou un isopropyle (DFP, isopropylpara-oxon), la stabilité du complexe est telle et la réactivation spontanée si lente qu'il est impossible de reproduire, sur la même préparation (nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat) la phase de potentialisation des contractions, même si on lave abondamment entre deux additions d'inhibiteur.

– haute fréquence de stimulation: le facteur régissant la réversibilité de l'inhibition de WEDENSKY est le même que le précédent: le radical R. BURGEN et HOBBIGER [1951] ont montré qu'une récupération permettant au muscle de soutenir des fréquences tétaniques de 25, 50 et 100 cycles par seconde est:

* complète et rapide (30 à 40 minutes) avec la diméthylphosphogtigmine,

* incomplète et lente avec le TEPP et la diéthylphosphogtigmine (1) pour une fréquence de 25 et 50 cycles par seconde et nulle à 100 cycles par seconde.

* nulle avec le DFP et l'isopropylphosphogtigmine après 90 minutes d'observation.

Ces résultats ont été confirmés avec le Para-oxon et le méthylpara-oxon par BARNES et DUFF [1953].

β) réactivation par une substance chimique (HOLMES et ROBINS [1955]).

Parmi les réactivateurs des ChE *in vitro*, le Pralidoxime apparait comme l'un des plus puissants que l'on connaisse actuellement.

Lors des premières expériences réalisées sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat traitée par un

(1) méthylsulfate de 0,0-diéthylphosphato-3 N-triméthyl phényl ammonium.

antiChE, cette oxime (à concentration de 10^{-2} M) s'est révélée sans action sur le blocage neuromusculaire produit par des fréquences tétaniques. Par la suite, ceci fut attribué à l'action propre de l'oxime qui résulte probablement d'une action sur la fibre musculaire: en effet, la réponse du diaphragme à la stimulation directe est diminuée après traitement par cette oxime. Il est donc important que le protocole d'expérimentation suivant soit adopté: après traitement de la préparation par un antiChE, on vérifie, par des hautes fréquences de stimulation, que le muscle est incapable de soutenir un tétanos. On ajoute au bain l'oxime et on laisse en contact oxime et préparation pendant quelques minutes. On lave et, immédiatement après lavage, on stimule de nouveau à fréquences tétaniques: aucune manifestation de blocage neuromusculaire n'apparait, signe d'une récupération très rapide.

L'action des oximes semble due entièrement à la réactivation des ChE inhibées. Des mesures d'activité cholinestérasique du diaphragme de Rat montrent que l'addition d'oxime, après TEPP, entraine une augmentation du pouvoir enzymatique des ChE en même temps qu'une récupération totale des propriétés musculaires.

Sur le blocage neuromusculaire par la *d*-tubocurarine ($1{,}1 \times 10^{-6}$ M), la succinyldicholine (3×10^{-5} M) et le décaméthonium (2×10^{-5} M), le Pralidoxime est sans action.

2) Action par un mécanisme autre que celui de l'inhibition des cholinestérases.

Bien que les découvertes histochimiques permettent des corrélations entre l'inhibition des ChE par les antiChE et les actions pharmacologiques aux régions étudiées, elles n'excluent pas la possibilité que certains effets soient dûs à une cause autre que l'inhibition enzymatique. Plusieurs faits viennent confirmer cet énoncé. Nous n'en mentionnerons ici que quelques-uns:

a) après inhibition complète par le DFP des ChE du *rectus abdominis* de Grenouille, MIQUEL [1946] a montré que la néostigmine et l'ésérine engendraient une contraction que n'influence pas le DFP.

b) la néostigmine exerce une action excitatrice directe sur la préparation soléaire – gastrocnémien chez le Chat, même après inactivation complète des ChE par le DFP (RIKER et WESCOE [1946]: voir RIKER [1953]).

c) MCNAMARA et coll. [1954] ont montré que, très souvent, il n'y avait aucun rapport entre le degré d'inhibition des ChE et les effets musculaires.

Il est cependant important de rappeler ici ce que nous avons mentionné précédemment, à savoir que:

– ce qui importe, c'est l'inhibition au niveau de certains sites sélectifs de la cellule,

– la détermination du pouvoir antiChE se fait sur des homogénats de cellule *in vitro*, ce qui ne donne pas une idée exacte de la véritable inhibition de l'AChE fonctionnelle ou active,

– vu les limites de sensibilité des méthodes utilisées lors de la détermination du pouvoir cholinestérasique, une très faible activité enzymatique pourrait peut-être suffire à la transmission neuromusculaire normale (BERRY et EVANS [1951]).

d) le blocage de la transmission par le DFP n'est pas dû exclusivement à l'accumulation de concentrations excessives d'ACh au niveau de la plaque: sur la préparation nerf phrénique-diaphragme isolés de Rat traitée au DFP (concentration de 2 à 5 x 10^{-4}M), le curare non seulement ne restaure pas la transmission, mais encore augmente le blocage à des influx uniques (BARSTAD [1956a]). Cet auteur émet même l'hypothèse que la solubilité des organophosphorés dans les lipides pourrait être la cause d'une détérioration des terminaisons nerveuses présynaptiques.

e) alors que la toxine botulinique diminue le nombre de quantums d'ACh libérés par les terminaisons nerveuses présynaptiques après stimulation du nerf (BROOKS [1954]), elle ne peut s'opposer à l'inhibition de WEDENSKY produite par le DFP. Le blocage neuromusculaire ne peut donc être uniquement dû à l'accumulation d'ACh au niveau de la plaque.

Tous ces faits parlent donc en faveur d'une action au moins double (actions propre et antiChE) des antiChE à la jonction neuromusculaire. Selon certains auteurs (COHEN et coll. [1955a, 1955b]) cette double action résulterait d'une similitude de structure entre certains sites des récepteurs et des AChE.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

INTRODUCTION

I°– MONTAGE NEUROMUSCULAIRE *IN SITU.*

1) Choix des animaux.

2) Choix de l'excitation
- a) stimulateur.
- b) paramètres utilisés.
- c) électrodes

3) Choix de l'enrégistrement.

4) Choix de l'anesthésique.
- a) chez le Rat.
- b) chez le Lapin et le Chat.

5) Description de la préparation.
- a) préparation du nerf sciatique.
- b) fixation du genou.
- c) préparation du tibial antérieur.
- d) préparation du soléaire.
- e) préparation nerf sciatique – muscles soléaire–gastrocnémien de Lapin pour injection intra-artérielle.
- f) fixation de la patte et des muscles. Mise en place des électrodes.
- g) énervation chez le Lapin et chez le Rat.
- h) pression artérielle.

6) Avantages du montage neuromusculaire *in situ*

7) Limites d'emploi du montage neuromusculaire *in situ*

II°– MONTAGE NEUROMUSCULAIRE *IN VITRO*

III°– DISCUSSION DE L'EMPLOI DE L'ÉTHANOL COMME SOLVAN

Pour étudier l'action de nos produits au niveau de la jonction myoneurale, nous avons fait appel à des montages nerf – muscle *in situ* de plusieurs espèces animales, mais les expériences de base ont été réalisées avec le Rat. Nous avons également utilisé un montage neuromusculaire *in vitro*. Ces préparations sont les suivantes:

- nerf sciatique - muscle tibial antérieur de Rat,
- nerf sciatique - muscle tibial antérieur de Lapin,
- nerf sciatique - muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin,
- nerf sciatique - muscles tibial antérieur et soléaire de Chat,
- nerf phrénique - muscle diaphragme isolés de Rat.

Nous référant tout particulièrement à Bourillet [1959] pour l'analyse des aspects théoriques et pratiques du montage nerf – muscle *in situ* chez le Chat et le Lapin, nous décrirons maintenant en détail les techniques mises en oeuvre.

I°– MONTAGES NEUROMUSCULAIRES *IN SITU*

1) Choix des animaux.

En raison du nombre des produits à étudier, de l'inhibition pratiquement irréversible des ChE par les organophosphorés, de l'accumulation de ces composés dans l'organisme et, par conséquent, de la nécessité de vérifier sur plusieurs animaux les effets produits par une même dose de produit, trois critères ont été à la base de notre choix:

- la facilité de se procurer les animaux et leur coût,
- un montage relativement rapide de la préparation,
- la constance des réactions de l'animal, se manifestant par la reproductibilité des résultats.

Le Rat nous est apparu alors comme répondant le mieux aux exigences préalablement décrites. En effet, on le trouve sans aucune difficulté et le prix d'achat est peu élevé, ce qui permet de multiplier les expériences; le montage s'effectue rapidement (une quinzaine de minutes); l'enregistrement des contractions est très régulier et les résultats sont parfaitement reproductibles.

Outre le Rat, nous avons également utilisé le Lapin et le Chat, plus sensibles au décaméthonium et à la succinyldicholine, substances du groupe des curarisants à action dépolarisante.

Nous avons discuté à la page 47 de l'influence du sexe sur la toxicité des organophosphorés. Afin d'éliminer toute source d'erreur liée à des processus métaboliques différents chez des animaux de sexe opposé, seuls les animaux mâles ont été retenus. Au cours des recherches effectuées sur la préparation nerf – muscle *in situ*, nous avons utilisé au total,

- 205 rats mâles, d'un poids compris entre 250 et 350 g,
- 18 lapins mâles, d'un poids de 2,5 à 3 kg,

– 4 chats mâles, d'un poids moyen de 3 kg.

Les rats d'un poids inférieur à 250 g ont souvent une résistance moindre; de plus, les contractions sont moins fortes et les veines trop petites. Ils n'ont donc pas été utilisés.

ZAIMIS [1952, 1953) a déterminé la sensibilité de plusieurs espèces animales à la *d*-tubocurarine (curarisant par compétition avec l'ACh ou curarimimétique) et au décaméthonium (paralysant par action dépolarisante ou acétylcholinomimétique). D'après ces travaux, une classification par ordre de sensibilité décroissante a été établie. Pour les trois espèces qui nous intéressent ici, cet ordre est le suivant:

pour la *d*-tubocurarine: Rat > Lapin > Chat

pour le décaméthonium: Chat > Lapin > Rat.

Une même substance peut avoir des actions différentes d'une espèce animale à une autre en raison, par exemple, d'une sensibilité particulière ou de processus métaboliques différents. Bien plus, chez la même espèce, des différences qualitatives se retrouvent pour des muscles différents. C'est ainsi qu'avec le décaméthonium, le mécanisme d'action des acétylcholinomimétiques s'exerce surtout chez le Chat (action pure), moins chez le Lapin (action mixte) et encore moins chez le Rat: en effet, chez ces deux dernières espèces, le décaméthonium se comporte comme un curarisant de type mixte, la curarisation débutant par une dépolarisation puis évoluant peu à peu vers une action compétitive. De plus, chez le Chat lui-même, seul le tibial réagit de façon pure; sur le soléaire au contraire, par répétition des doses, l'action dépolarisante se transforme peu à peu en action compétitive, de telle sorte qu'après un certain nombre d'injections, le décaméthonium exerce, vis-à-vis de ce muscle, son action curarisante en tant que curarimimétique et non plus en tant qu'acétylcholinomimétique. Des extrapolations qualitatives et quantitatives d'une espèce à l'autre, d'un muscle à un autre même, sont donc très difficiles.

La différence de sensibilité des espèces, que l'on constate au niveau du muscle tibial avec le décaméthonium, est beaucoup moins importante avec la succinyldicholine. Ainsi, le Chat est 100 fois plus sensible que le Rat au décaméthonium, mais il ne l'est même pas deux fois plus à la succinyldicholine. Si on considère, par contre, la sensibilité des animaux à la *d*-tubocurarine, le Rat est environ 7 fois plus sensible que le Chat.

Bien que nous ayons expérimenté sur des espèces différentes et sur des muscles différents pour une même espèce, des vérifications de sensibilité aux organophosphorés étudiés ont toujours été réalisées, pour permettre des comparaisons et une tentative d'explication du mécanisme d'action.

2) **Choix de l'excitation.**

a) stimulateur:

Nous nous sommes servi d'un stimulateur électronique (Racia, type GL 260). Parmi les caractéristiques de l'appareil, citons:

– la fréquence (nombre d'impulsions par seconde): réglable entre 0,1 et 1.000 cycles par seconde,

– la durée (largeur): 0,1 à 100 millisecondes, en 10 positions.

– le voltage (amplitude ou tension): la tension de sortie est variable à volonté de 0 à 100 volts, avec atténuateur au dixième et au centième,

– L'appareil peut fonctionner en relaxé, salves tétanisantes (300 cycles par seconde) et en top unique.

b) paramètres utilisés.

D'après les résultats expérimentaux obtenus, BOURILLET [1959] souligne l'importance du choix des paramètres: "il s'agit d'obtenir par stimulation du nerf moteur une contraction musculaire:

– maximale, c'est-à-dire mettant en jeu la totalité des fibres constituant le muscle,

– unique, c'est-à-dire qu'à un stimulus, chaque fibre réponde par une seule contraction,

– répétée à des intervalles réguliers, sans qu'interviennent des phénomènes de fatigue, de sommation ou d'inhibition."

Après considération de ces différents facteurs, nous avons employé chez le Rat, le Lapin et le Chat, les paramètres suivants:

∝) fréquence: un stimulus est appliqué au nerf toutes les dix secondes (six excitations par minute). Cette fréquence est idéale: elle est assez rapide pour permettre de suivre l'évolution des effets neuromusculaires après administration d'un produit, et elle est assez lente pour obtenir une récupération totale du muscle entre deux stimulus. Elle évite la fatigue musculaire puisqu'à plusieurs reprises, nous avons expérimenté sur le même animal pendant six heures et même davantage, sans noter une diminution importante de l'amplitude des contractions par rapport à l'amplitude initiale.

Pour les fréquences tétaniques, nous avons procédé de la manière suivante: on stimule le nerf à fréquence normale de six stimulus par minute. On enregistre les contractions sur un kymographe. Lorsque la préparation est stable, on interrompt la stimulation et on augmente la vitesse de rotation du tambour enregistreur. On règle le stimulateur à dix stimulus par seconde et on excite pendant cinq secondes. Trente et soixante secondes plus tard, on stimule pendant le même temps, avec une fréquence de 30 et 50 cycles par seconde. On réduit la vitesse de rotation du

tambour et on stimule de nouveau le nerf à la fréquence normale.

β) largeur ou durée du stimulus: pour une durée trop courte (égale ou inférieure à 0,1 milliseconde), le muscle répond souvent par des contractions d'amplitude inégale, selon le nombre d'unités motrices mises en jeu. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser une durée un peu plus grande, afin d'obtenir une réponse de toutes les unités motrices. Nous avons utilisé des stimulus d'une largeur de 0,2 milliseconde et, très rarement, de 0,5 milliseconde.

φ) voltage: la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Chat est peu sensible aux variations de tension, si la durée du stimulus a été choisie correctement (Bourillet [1959]). Il en est de même pour les préparations neuromusculaires du Lapin et du Rat. Le voltage seuil se situant aux environs de 2 volts, on excite le nerf par des voltages doubles, c'est-à-dire variant entre quatre et six volts. On a ainsi la certitude d'un voltage supramaximal.

c) électrodes:

Nous avons utilisé des électrodes en plexiglas, fabriquées au laboratoire. Deux fils de platine, gainés par un cathéter de polyvinyle, sont encastrés à deux millimètres de distance l'un de l'autre dans une plaque de plexiglas de cinq millimètres de largeur sur trois centimètres de longueur. A l'une des extrémités, la plaque est courbée et les fils sont mis à nu sur une distance de trois ou quatre millimètres, la partie dénudée faisant face à l'intérieur de la courbure. Une autre plaque de plexiglas de même dimension coulisse sur la première, jusqu'à la courbure de la plaque inférieure, laissant un canal de diamètre variable dans lequel le nerf est emprisonné (ce diamètre est de un, deux et trois millimètres respectivement pour les nerfs sciatiques de Rat, de Lapin et de Chat). L'emprisonnement du nerf à l'intérieur de ce canal facilite le maintien de l'électrode sur le nerf. Cependant, deux observations s'imposent:

– le diamètre intérieur du canal dans lequel le nerf est emprisonné doit être proportionnel à celui du nerf sciatique; un diamètre trop petit écraserait le nerf, entrainant des excitations mécaniques concomittantes aux excitations électriques.

– il est préférable que les électrodes stimulant le nerf soient placées le plus près possible du muscle, le pôle négatif dirigé vers la périphérie.

3) Choix de l'enregistrement.

Sous l'influence d'une excitation, un muscle se raccourcit ou résiste à l'extension. Lors de l'étude de la réaction musculaire par des appareils appelés myographes, ces deux propriétés mécaniques peuvent être mises à profit: on obtient deux types d'enregistrement différents.

Dans l'enregistrement isométrique, la longueur du muscle est maintenue constante pendant toute la durée de l'expérience; on enregistre les variations de tension mécanique, c'est-a-dire la déformation d'un ressort rigide auquel le muscle est relié par son extrémité libre. Cette déformation est amplifiée par un levier mécanique en contact avec un tambour noirci.

Dans l'enregistrement isotonique, la force appliquée au muscle est constante et celui-ci peut se raccourcir librement. Il est donc possible de suivre les variations de longueur au moment de l'excitation par enregistrement à l'aide d'un levier relié à un tambour noirci; d'autres procédés (cellule photo-électrique par exemple) peuvent aussi être employés.

Dans la série d'expériences réalisées, nous avons utilisé l'enregistrement isotonique (1); la force constante appliquée au muscle provient de la membrane de caoutchouc d'un tambour manipulateur de MAREY. Celui-ci est relié, par un tube de caoutchouc, à un tambour inscripteur de MAREY. Une clarinette, disposée sur le trajet du tube de caoutchouc, permet d'équilibrer le pression intérieure du système avec la pression atmosphérique. Cette transmission pneumatique présente deux avantages (BOURILLET [1959]):

a) "L'animal est placé sur un support de contention horizontal et dans une position de sommeil très physiologique, n'ayant pas à amener la patte à la verticale du style inscripteur",

b) "les réglages de la hauteur des contractions sont très faciles."

Le kymographe que nous avons utilisé (BRAUN, type l.000) permet, grâce à une gamme de 12 vitesses, une rotation du tambour variant entre 0,06 millimètre par seconde et 20,9 millimètres par seconde.

Appareil à contention et myographe utilisés pour le Chat et le Lapin (Figure 13):

sur une planche (a) de forme rectangulaire (30 x 90 centimètres), une tige métallique (b) de 30 cm de hauteur, fixée à huit cm d'un des angles, sert de point d'appui à une poulie à double articulation perpendiculaire (c) et au support (d) du tambour manipulateur de MAREY (e). La fixation du genou sur un bouchon de liège (f) (fixé à 27 cm de la tige) et du jarret sur un bouchon de caoutchouc (g) permet une immobilisation complète de la patte.

L'appareil à contention utilisé pour le Rat est identique à celui préalablement décrit; seules les dimensions et les distances respectives sont modifiées. On se sert d'une planche de 18 x 40 cm, le bouchon de liège (f) se trouvant à 16 cm de distance de la tige métallique (b) de 15 cm de hauteur, fixée à six cm de l'angle.

(1) voir: Limites d'emploi du montage neuromusculaire (page 94).

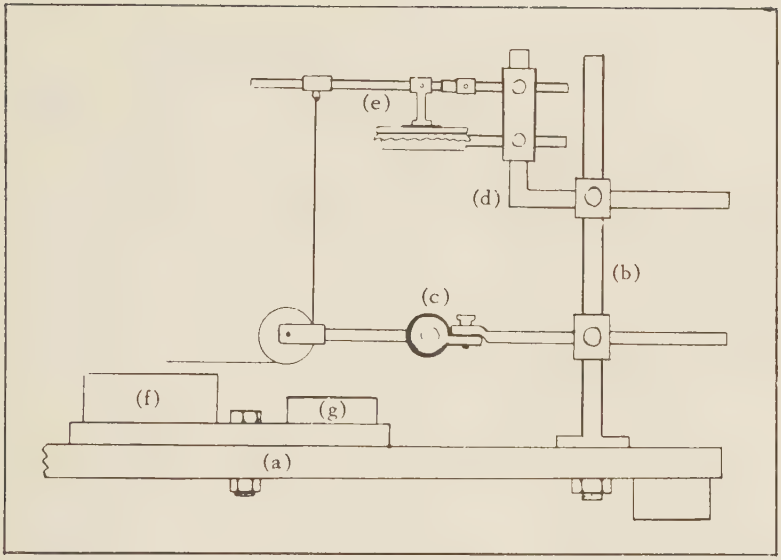


Figure 13: *Schéma de l'appareil à contention et du myographe (d'après* Bourillet [1959]).

4) Choix de l'anesthésique.

L'action de l'anesthésique doit être, d'une part, rapide (permettant un montage presqu'immédiat de la préparation) et, d'autre part, prolongée (ne nécessitant pas, en cours d'expérience, l'administration successive de deux ou plusieurs doses d'anesthésique, susceptible de modifier l'enregistrement concomittant de la pression artérielle). Pour obtenir cette double action, nous avons utilisé le mélange éthyluréthane ou chloralose – mébubarbital (Nembutal*). Ce dernier associe, à son action rapide, une suppression complète des réflexes, ce qui en fait un anesthésique de choix, spécialement pour le montage de la préparation nerf – muscle.

a) anesthésie chez le Rat: nous avons employé l'association mébubarbital – éthyluréthane, de début d'action rapide (cinq à dix minutes) et de durée assez prolongée (trois à quatre heures) pour les doses utilisées. Chez le rat ainsi anesthésié, la pression artérielle est stable, à la condition que l'animal soit maintenu dans un état de légère hypothermie. Les doses d'anesthésiques, par voie intrapéritonéale, sont de 30 mg/kg pour le mébubarbital (en solution à 6 mg/ml dans le soluté physiologique de chlorure de sodium) et de 400 mg/kg pour l'éthyluréthane (en solution à 80 mg/ml dans le soluté physiologique). Au moment de l'injection, on mélange, à parties égales, les deux solutions; on injecte le mélange à raison de 1 ml par 100 g de Rat.

b) anesthésie chez le Lapin et le Chat: nous avons utilisé le mélange mébubarbital (18 mg/kg) – chloralose (80 à 100 mg/kg, en solution à 1 p. 100 dans le soluté physiologique). L'injection a été pratiquée, chez le Lapin, par voie intraveineuse –dans une des veines marginales de l'oreille– et, chez le Chat, par voie intrapéritonéale. L'anesthésie est immédiate chez le Lapin, mais d'apparition plus lente (15 à 20 minutes) chez le Chat; dans les deux cas, sa durée est supérieure à six heures. Le mébubarbital exerce une action dépressive respiratoire très nette chez le Lapin; il est nécessaire de soumettre assez rapidement l'animal à la respiration artificielle.

Ces anesthésiques se sont avérés sans action propre sur la préparation neuromusculaire.

5) Description de la préparation.

On anesthésie l'animal, on le soumet à la respiration artificielle et on introduit une canule dans la veine jugulaire externe. En raison des faibles volumes injectés et pour éviter des pertes de produits au moment de l'injection, nous nous sommes servi du dispositif suivant:

un tube de caoutchouc très souple, de faible diamètre intérieur, long de six à huit centimètres et rempli de soluté physiologique, relie la canule à une seringue de cinq ml servant de "réservoir" pour le soluté physiologique qu'elle contient. A l'aide d'une seringue d'un ml graduée au centième, on introduit le produit dans le tube de caoutchouc entre la canule et une pince d'ULRICH, posée sur le tube à un cm de la canule; aucun reflux vers la seringue "réservoir" n'est alors possible. La substance est entraînée dans la circulation par un volume déterminé de soluté physiologique stocké dans la seringue de cinq ml: ce volume est d'un ml chez le Lapin et le Chat et de 0,4 ml chez le Rat. Chez celui-ci, la canule intraveineuse est remplacée par un cathéter de polyvinyle aux diamètres intérieur et extérieur de 0,5 mm et 1 mm. Une des extrémités est introduite dans la veine jugulaire externe et est maintenue par des ligatures, tandis que l'autre extrémité est reliée au système "réservoir" – tube de caoutchouc par l'intermédiaire d'une aiguille hypodermique.

a) préparation du nerf sciatique.

On rase la patte; on coupe la peau du creux poplité jusqu'aux muscles fessiers. On sépare les masses musculaires des muscles biceps fémoral et demi-tendineux et on voit apparaitre le nerf sciatique que l'on isole (sans le tirer) sur toute la longueur de la cuisse. On place deux ligatures, distantes d'environ un demi centimètre et situées le plus haut possible sur le nerf, afin de ne pas supprimer l'irrigation sanguine par les petits vaisseaux nourriciers.

b) fixation du genou.

L'obtention de tracés réguliers nécessite une fixation parfaite de la patte; elle est assurée au niveau de l'articulation du genou et du jarret. Après rasage des parties latérales interne et externe du genou, on sectionne la peau de la partie antérieure de l'articulation sur une longueur de deux à trois cm (un cm chez le Rat), afin de mettre à nu la région condylienne du fémur. Une mèche de 3,5 mm de diamètre, dont l'extrémité se termine par une vrille, permet de traverser facilement les condyles fémoraux de part en part; chez le Rat, cette mèche est remplacée par un clou d'une longueur de trois à quatre cm et d'un diamètre d'environ un mm. Par l'intermédiaire de la mèche ou du clou, introduit dans un bouchon de liège, on fixe solidement le genou à l'appareillage.

c) préparation du tibial antérieur.

Chez le Chat, "c'est le plus volumineux des muscles de la région antérieure: il est situé au plan superficiel en avant et en dedans de l'extenseur commun des doigts et forme le bord antérieur de la jambe. Il s'insère en haut sur le condyle externe et la surface externe de la crête tibiale. Son corps charnu aplati dans sa partie supérieure est tourné d'abord en dehors puis en avant; il vient en contact du groupe des péroniers. Vers le quart inférieur de la région, il se continue en tendon arrondi qui se dirige en dedans, s'engage sous la bride tibio-tarsienne du pli du jarret pour gagner le métatarsien du doigt II. Ce muscle est particulièrement large chez le Chat" (Bourdelle et Bressou [1953]). L'anatomie du tibial antérieur est comparable chez le Lapin et chez le Rat.

Après rasage de la partie antérieure de la jambe, on sectionne la peau et on dégage le tendon sur deux cm après son insertion osseuse métatarsienne. On le sectionne et on le glisse sous la bride tibio-tarsienne; le tendon est lié solidement avec un fil de grosseur moyenne d'environ vingt cm de longueur. On sectionne les aponévroses et on dégage le muscle le plus possible. On humecte de soluté physiologique pour éviter qu'il ne se dessèche.

d) préparation du soléaire.

Chez le Chat, "c'est un muscle du mollet, relativement volumineux, situé au côté externe des jumeaux. Corps charnu aplati, inséré sur la tête du péroné et sur la face postérieure du muscle fléchisseur externe des phalanges sous-jacent. Il s'engage sur le jumeau externe et se continue par un tendon long et arrondi que l'on peut suivre accolé au côté externe du tendon d'Achille jusqu'au niveau du calcanéum où il se termine" (Bourdelle et Bressou [1953]).

On rase la partie postérieure de la jambe et on coupe la peau à partir du calcanéum jusqu'au creux poplité. Après avoir

dégagé le tendon d'Achille de ses aponévroses, on dissèque au milieu de celui-ci le fin tendon du soléaire, encastré à l'intérieur et du côté externe des autres tendons. Le muscle soléaire, de couleur rose foncée, se reconnait facilement de la masse musculaire environnante, de couleur rose beaucoup plus pâle. On place trois ligatures:

– une première comprenant tout le tendon d'Achille au ras du calcanéum,

– une seconde (constituée d'un long fil d'environ 20 cm) comprend tout le tendon d'Achille, à un cm de la ligature précédente,

– une troisième, un cm plus haut, comprenant le tendon d'Achille sans celui du soléaire.

On sectionne entre chaque ligature: le long fil de 20 cm est attaché à un morceau d'un cm du tendon d'Achille, auquel est fixé le tendon du soléaire.

e) préparation nerf sciatique – muscles soléaire-gastrocnémien de Lapin pour injection intra-artérielle proche des muscles.

Lors de l'étude du mécanisme et du lieu d'action du 8056 HC et du 8061 HC, l'injection intra-artérielle proche des muscles s'est avérée indispensable. Cependant, l'artère sortant du tibial antérieur est trop petite chez le Lapin pour qu'on puisse y introduire une canule ou un cathéter. Nous avons donc utilisé une technique mise au point dans ce laboratoire par OLIVE: le produit, injecté dans l'artère fémorale superficielle, est transporté par l'artère fémorale profonde à tous les muscles de la jambe. Pour s'assurer que le composé n'est distribué qu'aux muscles soléaire et gastrocnémien (intimement accolés chez le Lapin, le soléaire se confondant dans la masse musculaire du gastrocnémien), toute collatérale n'irriguant pas ces muscles est ligaturée.

Le montage de la préparation s'effectue de la façon suivante:

On rase la partie interne de la patte. On coupe la peau le long du trajet des artères fémorales commune et superficielle. On isole et sépare l'artère de la veine puis on ligature toutes les collatérales artérielles. On résèque le nerf crural. A trois ou quatre cm de l'embranchement donnant naissance aux artères fémorales superficielle et profonde, on sectionne la première entre deux ligatures et on y introduit une canule à contre-courant. On dégage bien l'origine de l'artère fémorale profonde qui s'enfonce, quelques centimètres plus bas, dans le muscle adducteur de la cuisse. A l'aide d'une sonde suivant le trajet de l'artère et servant de guide, on sectionne le muscle: on découvre le creux poplité, permettant ainsi de mieux suivre le trajet et les ramifications des vaisseaux fémoraux profonds. On isole l'artère et on ligature toutes les collatérales (dont les vaisseaux capsulaires et poplités

externes), sauf celles irriguant les muscles gastrocnémien-soléaire. On dégage le gastrocnémien de ses adhérences aponévrotiques et on coupe le tendon d'Achille entre deux ligatures. Au cours du montage, il est important de respecter la veine fémorale profonde et d'humecter régulièrement les artères fémorales commune, superficielle et profonde avec une solution de procaïne à 2 p. 100. Cet anesthésique local permet la vasodilatation des artères, ce qui facilite la dissection et prévient les spasmes artériels. Il faut cependant éviter tout contact entre la solution de procaïne et le nerf sciatique.

modalité d'injection: au moment de l'administration du produit, on place une pince hémostatique sur l'artère fémorale commune. Le produit, dissout dans 0,1 ml de soluté physiologique, est injecté, par l'intermédiaire de la canule artérielle, dans l'artère fémorale superficielle et est entrainé dans le muscle par 0,2 ou 0,3 ml de soluté physiologique hépariné (50 U.I. d'héparine par ml de solution). Le volume total injecté doit être inférieur à 0,4 ml. La circulation reste interrompue pendant quinze secondes, pour permettre un meilleur contact entre le produit et le muscle, puis on enlève la pince hémostatique, rétablissant ainsi la circulation.

Sur cette préparation, nous avons recherché l'action potentialisatrice du 8061 HC sur la contraction (1) par l'ACh exogène. Nous avons suivi le protocole suivant:

après montage de la préparation, on stimule le muscle indirectement avec des paramètres supramaximaux. Lorsque l'amplitude de la contraction est stable, on interrompt la stimulation puis la circulation intramusculaire par le moyen d'une pince hémostatique placée sur l'artère fémorale commune. On injecte très brusquement l'ACh (15 à 30 μg dans un volume de 0,3 ml de soluté physiologique): on obtient une contraction. On rétablit circulation et stimulation et on répète la même opération dix minutes plus tard afin d'obtenir des contractions témoins (2). On injecte le produit à étudier et, après le temps nécessaire à l'apparition de l'action neuromusculaire de l'organophosphoré, on répète les injections d'ACh. On vérifie ainsi l'action du composé sur la contraction à

(1) En fait, ce n'est pas une véritable contraction, identique à celle que l'on obtient par stimulation du nerf. Elle s'apparente à cette dernière en ce qu'elle est brève, mais aussi à la contracture parce que l'acétylcholine exogène agit au niveau de la plaque par stimulation répétitive. BROWN et coll. [1936] la considèrent comme une contraction de type tétanique.

(2) Le muscle s'insensibilise graduellement à l'ACh exogène ainsi injectée; l'amplitude de la contraction diminue alors peu à peu avec la répétition des injections.

l'ACh exogène. L'enregistrement des contractions musculaires par stimulation du nerf sciatique permet de comparer l'action propre du produit par rapport à son action sur l'ACh exogène.

f) fixation de la patte et des muscles. – Mise en place des électrodes.

On place la patte sur les deux bouchons et on enfonce la mèche ou le clou dans le bouchon de liège (voir page 89). On serre le lien (fixé sur le bouchon de caoutchouc) au niveau du jarret. Le fil, fixé au tendon du muscle, est relié au levier d'un tambour manipulateur de MAREY par l'intermédiaire d'une poulie située à l'extrémité d'une tige à double articulation perpendiculaire. Ce système permet à la poulie d'occuper une position telle que le muscle travaille dans une direction proche des conditions physiologiques.

On place l'électrode sur le nerf, le plus près possible du muscle, le pôle négatif vers la périphérie et le pôle positif vers les centres. On branche le stimulateur. Une durée de 15 à 30 minutes est nécessaire à la stabilisation de la préparation.

g) énervation chez le Lapin et chez le Rat.

Le voltage et la durée du stimulus nécessaires à l'excitation directe supramaximale d'un muscle sont considérablement supérieures aux paramètres utilisés pour la stimulation indirecte. Une partie de l'influx est susceptible de diffuser jusqu'au niveau des terminaisons nerveuses motrices et entrainer ainsi la contraction de certaines fibres par excitation indirecte. On aurait pu éviter ce phénomène avec des préparations curarisées, mais à la condition que le produit étudié ne soit pas un antagoniste de la *d*-tubocurarine, ce qui est malheureusement le cas des antiChE. En conséquence, l'énervation, suivie d'une dégénérescence nerveuse, nous a paru indispensable pour la vérification d'une action directe de nos dérivés sur le muscle tibial antérieur. Nous avons procédé de la façon suivante:
on rase la partie latérale externe du genou et la partie supérieure latérale de la jambe. On badigeonne avec de l'éthanol à 95°. A environ un cm de la partie inférieure de l'articulation du genou et parallèlement à l'axe de la jambe, on coupe la peau sur deux cm chez le Lapin et sur un cm chez le Rat. On sectionne les aponévroses et on écarte les plans musculaires. On voit apparaitre, en profondeur, un mince filet blanc (le nerf sciatique) qui se ramifie en deux branches: les nerfs sciatiques poplités interne et externe. Afin de ne pas entrainer une paralysie totale de la jambe, on ne sectionne que le poplité externe, sur une longueur d'environ un demi cm. L'activité nerveuse du poplité interne permet certains mouvements de la jambe; ceux-ci exercent un massage sur le tibial énervé et préviennent ainsi une trop grande atrophie musculaire. On nettoie la plaie avec de l'éthanol à 95° et on saupou-

dre avec un antibiotique pour éviter des infections ultérieures, assez fréquentes surtout chez le Lapin. On recoud plan par plan avec du catgut. Au lieu de recoudre la peau, il est préférable d'utiliser des agrafes; l'animal ne pourra les enlever avec ses dents –comme c'est le cas avec le catgut– et entrainer une réouverture de la plaie.

La dégénérescence est complète après 15 jours chez le Rat et 21 jours chez le Lapin.

Le montage de la préparation est identique à celui du nerf sciatique – muscle tibial antérieur préalablement décrit. Le sciatique est aussi isolé afin de vérifier que l'énervation a été réussie et que le muscle ne répond plus aux excitations indirectes. On introduit dans le muscle trois électrodes de platine:

– la première est reliée au pôle négatif du stimulateur. Elle est introduite dans la partie médiane du muscle,

– les deux autres sont reliées au pôle positif du stimulateur et sont introduites aux extrémités supérieure et inférieure du muscle.

Les paramètres utilisés sont les suivants:

– fréquence: 6 cycles par minute,
– largeur : 0,2 à 0,5 milliseconde,
– voltage : 60 à 80 volts.

h) pression artérielle.

Pour la plupart des expériences réalisées, nous avons enregistré en continu la pression intracarotidienne. Les résultats nous ont permis d'établir des corrélations entre les actions musculaires et artérielles, et surtout de vérifier si l'amplitude des contractions, dans certaines expériences, n'était pas influencée par les variations de pression.

6) Avantages du montage neuromusculaire *in situ* (Bourillet[1959])

La préparation neuromusculaire *in situ* offre l'avantage incontestable d'utiliser l'animal entier. Ainsi, le ou les muscles sont étudiés dans des conditions physiologiques normales d'innervation et surtout d'irrigation.

Si on fait exception d'une action sur le S.N.C. pouvant se manifester par voie humorale, les effets obtenus après administration d'une substance chimique résultent d'actions périphériques, c'est-à-dire d'une action au niveau des terminaisons nerveuses motrices, de la plaque motrice (antiChE) ou de la fibre musculaire. L'enregistrement des contractions permet de vérifier une potentialisation des contractions (antiChE) ou une diminution passagère de l'amplitude (curarisants). Dans ce cas, les différences observées pour les muscles blancs et rouges permettent d'obtenir des renseignements utiles sur le mécanisme d'action de cette substance curarisante inconnue.

La recherche d'une action antagoniste ou potentialisatrice sur les deux classes de curarisants (curarimimétiques ou acétylcholinomimétiques) fournit des données précieuses pour la connaissance du mécanisme d'action de cette substance antagoniste. Cet antagonisme peut être réalisé à titre curatif ou à titre préventif, bien que ce dernier soit d'une application plus délicate à cause d'une sensibilisation de la préparation pour des doses ultérieures.

Pour qu'une substance soit dite potentialisatrice de la paralysie neuromusculaire, elle ne doit posséder, par elle-même, et aux doses utilisées, aucune action paralysante propre, sinon les deux substances agiraient en synergie.

Lors de la recherche d'un antagonisme ou d'une potentialisation de la curarisation par les organophosphorés de la série étudiée, nous avons utilisé, comme curarimimétique, la *d*-tubocurarine et, comme acétylcholinomimétique, la succinyldicholine. Les doses administrées sont les suivantes:

	d-tubocurarine	succinyldicholine
Rat :	50 à 60 µg/kg	100 à 125 µg/kg
Lapin :	350 à 450 µg/kg	70 à 80 µg/kg
Chat :	350 à 450 µg/kg	65 à 75 µg/kg

7) **Limites d'emploi du montage neuromusculaire** *in situ*.

Le phénomène observé est le résultat d'une action globale. L'élucidation du mécanisme d'action d'un composé nouveau n'est possible que par comparaison de ses effets avec ceux de substances pharmacologiques à mécanisme d'action connu et aussi par étude des interactions réciproques. Cependant, des réactions imprévisibles sont toujours possibles et l'interprétation des résultats nécessite toujours certaines réserves.

Cette préparation permet surtout des évaluations qualitatives. Cependant, des résultats quantitatifs sont possibles. Ainsi, l'injection intra-artérielle proche permet une précision supérieure à celle que peut donner toute autre voie d'administration, bien que la voie intraveineuse par exemple soit plus physiologique. Dans le cas des organophosphorés, le phénomène d'accumulation et d'inhibition presqu'irréversible des ChE nécessite la multiplication des expériences.

Même si les contractions musculaires sont obtenues par un enregistrement dit isotonique, en réalité, celui-ci est partiellement isométrique du fait de la résistance apportée par la membrane de caoutchouc du tambour de MAREY.

II°– MONTAGE NEUROMUSCULAIRE *IN VITRO*.

Préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat (BÜLBRING [1946]).

Sur un rat de 150 à 200 g, on prélève l'hémidiaphragme gauche ou droit, découpé en triangle et pourvu de son nerf phrénique. On immerge la préparation dans un bain de 100 ml de TYRODE, enrichi de glucose (1 gramme par litre) et oxigéné par du carbogène à 5 p. 100 de CO_2. Le nerf est stimulé périodiquement par des influx rectangulaires fournis par un stimulateur électronique:

– fréquence: 6 cycles par minute

– fréquences tétaniques: 25, 50 et 100 cycles par seconde pendant cinq secondes.

– largeur : 0,1 milliseconde,

– voltage : 5 à 6 volts.

L'électrode positive est placée dans le bain. L'électrode négative est réalisée de la manière suivante: l'extrémité du nerf passe à travers une fine membrane de caoutchouc obturant un petit tube de verre rempli de TYRODE dans lequel plonge un fil de platine relié au pôle négatif du stimulateur.

III°– DISCUSSION DE L'EMPLOI DE L'ÉTHANOL COMME SOLVANT.

L'insolubilité dans l'eau de sept des dix produits à étudier (les 7901 HC, 8014 bis HC et 8014 HC étant solubles) a posé des problèmes particuliers, difficiles à résoudre. Nous avions pensé utiliser la voie intrapéritonéale comme voie d'administration, mais une série d'expériences nous en montrèrent les inconvénients: des doses très fortes, voisines de la DL 50 par voie intrapéritonéale chez la Souris, devaient être injectées pour ne donner que des effets (potentialisation musculaire) relativement faibles. Nous avons alors opté pour la voie intraveineuse.

1) Solubilisation *in vivo*.

Nous avons recherché, parmi le diéthylèneglycol, le propylèneglycol et l'éthanol à diverses dilutions, le solvant "idéal" au point de vue solubilité des produits et actions pharmacologiques propres du solvant:

a) lorsqu'on ajoute, à une solution d'organophosphoré solubilisé dans un de ces trois solvants, un égal volume d'eau, on obtient une suspension (8056 HC) ou une émulsion (7900 HC, 8057 HC, 8062 HC, 8059 HC), tandis que le 8061 HC et 8063 HC demeurent en solution. Nous devions alors nous résoudre

– à augmenter le volume de solvant pour éviter l'émulsion ou

la précipitation, sans être certain cependant que ces phénomènes ne se produiraient pas dans les vaisseaux, ou

– à solubiliser les produits dans un volume minimal de solvant et accepter l'émulsion ou la suspension dans le dispositif même servant à l'injection (tube de caoutchouc reliant la canule à la seringue "réservoir").

Nous avons opté pour le second membre de l'alternative.

b) l'éthanol à 95° apparait comme le solvant le plus acceptable *in vivo*. En effet, pour un volume de 0,1 ml, l'éthanol à 95° ne manifeste aucune action sur la préparation neuromusculaire ou sur la pression artérielle de Chat, de Lapin ou de Chien. Chez le Rat, on note une forte hypotension (trois à quatre cm de mercure), mais elle n'est que transitoire puisqu'une ou deux minutes après l'injection, la pression est revenue à son niveau initial.

En raison de toutes ces considérations et sauf indication contraire, un volume fixe (quel que soit le poids ou l'espèce animale) de 0,1 ml d'éthanol à 95° a été choisi comme solvant de la quantité de produit à injecter.

Il est évident que l'administration d'un produit sous forme de fines gouttelettes (émulsion) ou de fines particules cristallines (suspension: 8056 HC) peut faire naître de graves inquiétudes, puisque la substance peut jouer le rôle d'obturateur mécanique des vaisseaux. Nous avons alors vérifié, par des doses même dix fois supérieures à celles utilisées lors de notre expérimentation, qu'aucun accident ne se produisait. De plus, la constance des résultats expérimentaux sur la préparation neuromusculaire de Rat est, à notre avis, une preuve supplémentaire que les conditions dans lesquelles nous nous sommes placé sont acceptables. (Voir aussi page 118).

2) Solubilisation *in vitro*.

En raison de l'activité des organophosphorés étudiés *in vitro* et des faibles concentrations nécessaires lors de l'expérimentation sur les organes isolés, nous avons réussi, dans ces cas, à solubiliser ces composés dans un volume d'eau (ou de TYRODE par exemple) compatible avec la préparation.

CHAPITRE III

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

INTRODUCTION

I°– ACTION PROPRE À BASSE FRÉQUENCE DE STIMULATION

1) Thiolophosphates.
   a) Chez le Rat
   b) Chez le Lapin
   c) Chez le Chat.
2) Thionophosphates.
   a) Chez le Rat.
   b) Chez le Lapin.
3) Substances de référence
4) Actions propres communes aux thiono- et aux thiolophosphates.
   a) Sialorrhée.
   b) Lacrymation.
   c) Défécation.
   d) Pression artérielle.
5) Proportionnalité dose-activité. Sommation des doses.
   a) Doses infraliminaires.
   b) Doses submaximales.
   c) Doses maximales.
   d) Doses supramaximales.
6) Essai d'interprétation des résultats. Relations structure-activité.
   a) Thiolophosphates.
   b) Thionophosphates.
   c) Classification et comparaison.

II°– ACTION PROPRE À HAUTE FRÉQUENCE DE STIMULATION

1) Préparation nerf - muscle *in situ.*
   a) Doses infraliminaires.
   b) Doses maximales ou supramaximales.
2) Préparation nerf - muscle *in vitro.*
3) Essai d'interprétation des résultats.

III°– ANTAGONISME *d*–TUBOCURARINE – ANTICHOLINESTÉRASIQUES.

1) Antagonisme de la curarisation par les anticholinestérasiques.
   a) à titre curatif
   b) à titre préventif.
2) Antagonisme des anticholinestérasiques par la *d*-tubocurarine.
   a) à titre curatif.
   b) à titre préventif.
3) Essai d'interprétation des résultats.

IV°– ANTAGONISME OU POTENTIALISATION VIS-À-VIS DE LA SUCCINYLDICHOLINE.

1) Chez le Rat.
2) Chez le Lapin
3) Chez le Chat.
4) Essai d'interprétation des résultats.

V°– ACTION DU MÉTHYLSULFATE DE PRALIDOXIME.

1) Action propre.
2) Action vis-à-vis des dérivés étudiés à basse fréquence de stimulation.
   a) action à titre préventif.
   b) action à titre curatif.
3) Action vis-à-vis des dérivés étudiés à haute fréquence de stimulation.
4) Action vis-à-vis de la curarisation.
5) Essai d'interprétation des résultats.

VI°– TENTATIVE DE RECHERCHE DU LIEU ET DU MÉCANISME D'ACTION.

1) Action des dérivés sur la préparation nerf sciatique – muscles gastrocnémien–soléaire après injection intra-artérielle proche.
2) Action des thiophosphates sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat.
   a) Action du 8061 HC.
   b) Action du 8056 HC.
3) Recherche d'une action directe des thiophosphates sur le muscle tibial antérieur énervé.
   a) Chez le Rat.
   b) Chez le Lapin.
4) Potentialisation de la contraction à l'acétylcholine exogène après injection intra-artérielle proche par le 8061 HC.
5) Essai d'interprétation des résultats.

Dans l'exposé que nous avons fait sur l'action générale des organophosphorés à la jonction neuromusculaire (page 71), nous avons considéré les effets obtenus d'une part à basse fréquence et d'autre part à haute fréquence de stimulation. Nous procéderons de la même manière en décrivant les résultats expérimentaux. Puis, nous discuterons des actions antagonistes ou potentialisatrices des dérivés étudiés sur la curarisation par la *d*-tubocurarine ou la succinyldicholine, ainsi que du pouvoir réactivateur du Pralidoxime (Contrathion*). Nous terminerons enfin par les résultats de quelques expériences complémentaires réalisées dans le but d'élucider partiellement le lieu et le mécanisme d'action.

A moins d'indications contraires, les résultats expérimentaux ont été obtenus à partir d'expériences réalisées sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat; l'administration du produit, dissout dans 0,1 ml d'éthanol à 95°, a été pratiquée par la veine jugulaire externe.

Les résultats de notre expérimentation au niveau de la jonction neuromusculaire sont avant tout d'ordre qualitatif. Cependant, le grand nombre d'expériences réalisées permet des conclusions d'ordre quantitatif, se rapportant principalement à des comparaisons dose-activité et permettant une classification des produits les uns par rapport aux autres.

Les valeurs exprimées dans les tableaux, les figures et le texte correspondent à des valeurs moyennes, calculées à partir d'un minimum de trois expériences concordantes.

I°– ACTION PROPRE À BASSE FRÉQUENCE DE STIMULATION (6 stimulus/minute).

Les dérivés organophosphorés de la série étudiée (sauf les 7900 HC, 8059 HC et 8014 bis HC) potentialisent les contractions maximales obtenues par stimulation indirecte. Pour chacun de ces produits, nous avons déterminé:

- la dose infraliminaire, c'est-à-dire la dose maximale inactive,
- la dose minimale active: c'est la dose pour laquelle débute l'action potentialisatrice des contractions,
- la dose minimale potentialisatrice maximale (D.Min.P.Max.), c'est-à-dire la plus petite dose pour laquelle la potentialisation des contractions est maximale,
- l'action d'une ou de deux doses submaximales.
- l'action de doses supraxamimales, c'est-à-dire supérieures à la D.Min.P.Max.

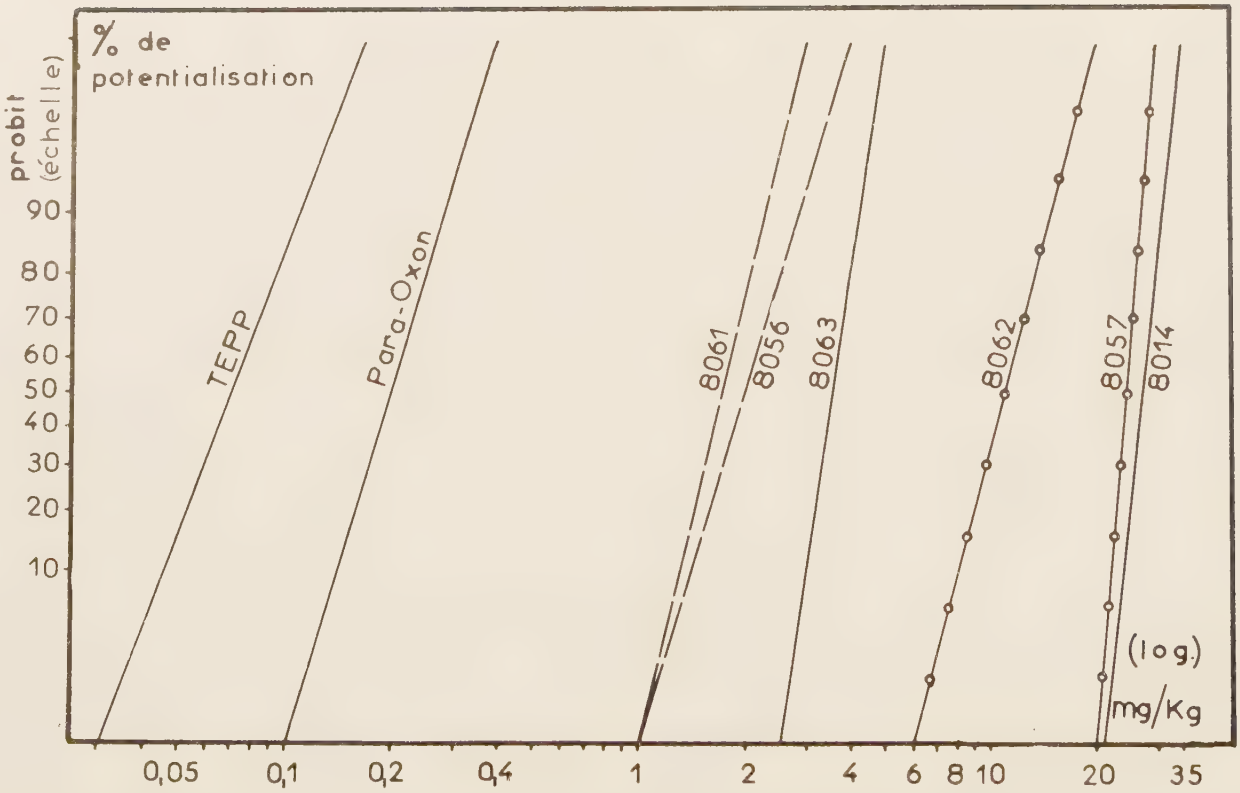


Figure 14: *Relation dose-potentialisation des contractions par les thio-phosphates étudiés sur la préparation nerf sciatique — muscle tibial antérieur de Rat.*

L'expression du pourcentage de potentialisation (1) en unités "probits" et des doses en échelle logarithmique nous a permis de transformer les sigmoïdes dose-réponse en droites. Les droites dose-potentialisation sont réunies dans la Figure 14.

1) Thiolophosphate: action d'une dose minimale potentialisatrice maximale.

a) Chez le Rat.

α) 8061 HC, 8062 HC, 8063 HC, 8014 HC:

Après administration d'un de ces dérivés, des fasciculations musculaires disséminées apparaissent et augmentent rapidement en nombre et en fréquence. Elles deviennent rapidement généralisées et de véritables "vagues successives de frissonnements" parcourent l'animal dans toutes les directions. Au niveau du muscle tibial antérieur, elles ont une intensité variable, mais on peut souvent suivre leur fréquence d'apparition sur le tracé d'enregistrement (Figure 15). Avec le début des fasciculations correspond une augmentation de l'amplitude des contractions musculaires. Cette potentialisation (Figures 15, 18, 22, 26 et 28) débute environ une minute après l'injection –le temps de latence est réduit au temps circulatoire– puis atteint un maximum en deux ou trois minutes; ce plateau se maintient pendant quelques minutes avant qu'une phase de décroissance ne ramène les contractions à leur amplitude initiale. Le temps nécessaire au retour à la normale est d'environ 30 à 40 minutes; cependant, pour le 8014 HC, la récupération n'est totale qu'après une heure. Les fasciculations disparaissent progressivement et parallèlement à la potentialisation des contractions.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau XVI.

β) 7901 HC:

Parmi les thiolos étudiés, seul le 7901 HC s'est révélé à peu près inactif sur la préparation nerf – muscle. Des doses de 5 à 500 mg/kg ont été administrées; des doses supérieures à 500 mg/kg sont toujours mortelles.

On obtient un début d'action avec une dose de 250 mg/kg: après un temps de latence d'environ 50 minutes, une phase de potentialisation des contractions s'amorce très lentement. A dose plus forte, la potentialisation n'est que très faiblement augmentée, mais le temps de latence est par contre diminué: il est de 40 minutes pour 300 mg/kg et de 30 minutes pour 500 mg/kg. La durée d'action est de plusieurs heures. Aucune fasciculation mus-

(1) Dans la Figure 14, le pourcentage de potentialisation des contractions, obtenue par une dose active de produit chez le Rat, n'est pas calculé par rapport à l'amplitude initiale des contractions mais par rapport à une contracture tétanique témoin.

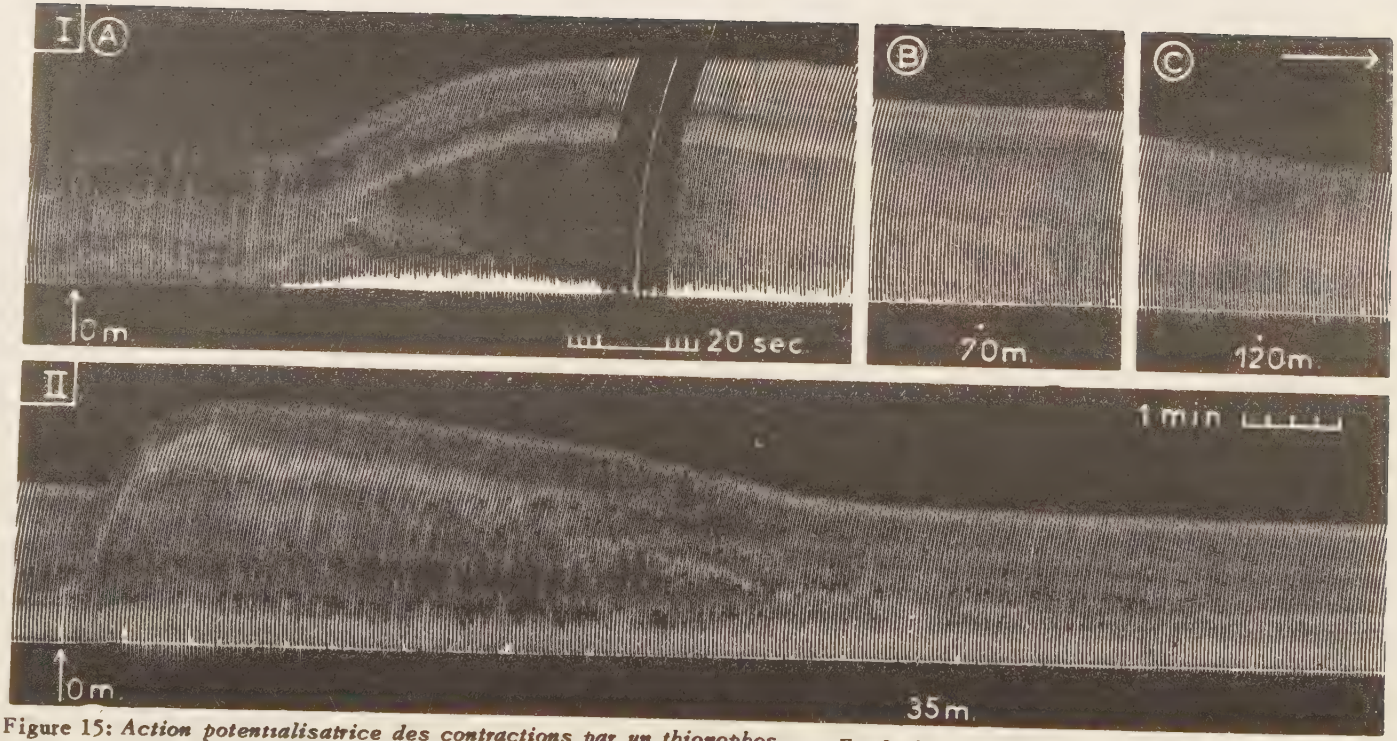


Figure 15: *Action potentialisatrice des contractions par un thionophosphate (8057 HC) et par son isomère thiolophosphate (8062 HC) sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En I: à t = 0 minute, 8057 HC 30 mg/kg
En II: à t = 0 minute, 8062 HC 20 mg/kg
(Cliché réduit aux 2/3)

culaire n'apparait, même si l'amplitude des contractions est augmentée.

Nous avons constaté, à plusieurs reprises, un fait curieux: alors qu'une dose de 300 mg/kg par exemple (Figure 16) n'entraine qu'une faible potentialisation –très longue par ailleurs à se manifester–, au contraire, une dose de 100 mg/kg, injectée 85 minutes après une première dose de 200 mg/kg (ce qui fait donc un total de 300 mg/kg), produit une potentialisation instantanée (Figure 16). La première dose semble donc sensibiliser la préparation à des doses ultérieures.

b) Action du 8061 HC chez le Lapin (Figures 31 et 32).

Sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Lapin, le 8061 HC potentialise les contractions. On observe un début d'action avec une dose de 2 mg/kg, mais l'augmentation d'amplitude est faible (environ 25 p. 100). Comme nous ne nous sommes intéressé qu'à l'étude qualitative chez cet animal, nous avons choisi, après quelques expériences, une dose de 5 mg/kg, légèrement supramaximale, afin d'annuler les sensibilités particulières de chaque animal. Après l'injection d'une telle dose, on obtient immédiatement une forte potentialisation, accompagnée d'une chute transitoire du tonus musculaire. Cette action potentialisatrice est beaucoup moins prolongée que chez le Rat, puisqu'elle ne dure que 15 à 20 minutes seulement. Sur les muscles soléaire–gastrocnémien, l'effet est à peu près identique; il n'y a cependant aucune baisse de tonus et le retour à l'amplitude initiale est à peine accéléré.

c) Action du 8061 HC chez le Chat (Figure 17).

Sur la préparation nerf sciatique – muscles tibial antérieur et soléaire de Chat, le 8061 HC potentialise également les contractions. L'action est instantanée, mais le plateau de potentialisation est plus rapidement obtenu pour le tibial que pour le soléaire. Ainsi, lorsque les contractions du soléaire atteignent leur amplitude maximale, celles du tibial sont déjà dans leur phase de décroissance. Chez cet animal, le soléaire est beaucoup plus sensible au 8061 HC que le muscle tibial. Cette sensibilité se manifeste tant par l'amplitude que par la durée de la phase potentialisatrice.

α) amplitude des contractions:

pour une dose de 2,5 mg/kg, l'amplitude des contractions du muscle tibial n'est pas modifiée, alors que celle du soléaire est augmentée de 60 p. 100. Si on injecte, 30 minutes plus tard, une dose de 5 mg/kg, la potentialisation des contractions du tibial est de 45 p. 100, alors que celle du soléaire est de 200 p. 100. Sur la Figure 17, cette différence se retrouve, mais elle est moins significative.

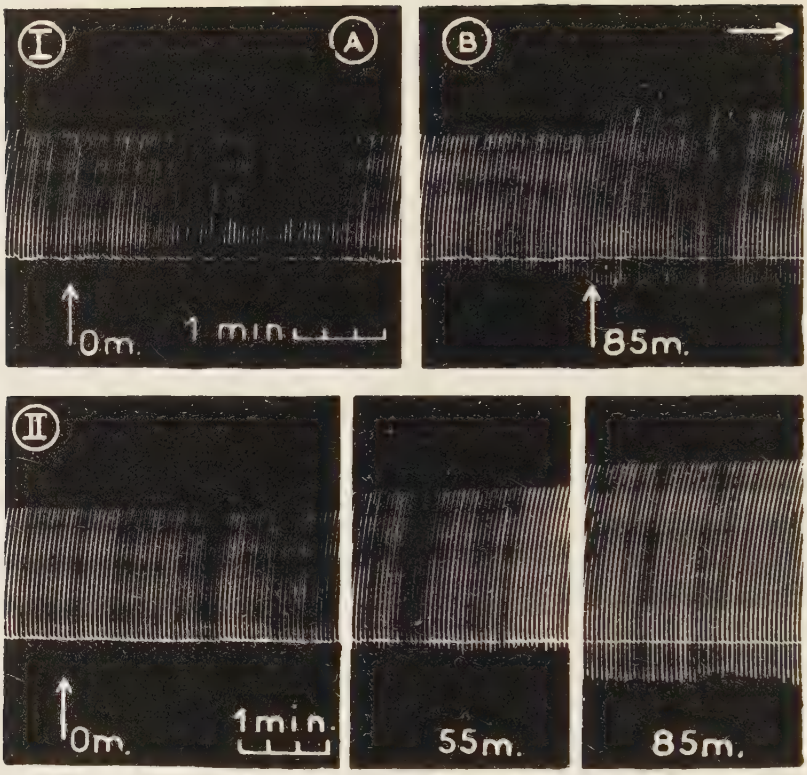


Figure 16: *Action potentialisatrice des contractions par le 7901 HC sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En I: à t = 0 min. 7901 HC 200 mg/kg
à t = 85 min. 7901 HC 100 mg/kg
En II: à t = 0 min. 7901 HC 300 mg/kg

(Cliché réduit aux 7/9)

β) durée d'action:

la durée de la phase potentialisatrice est beaucoup plus courte sur le muscle tibial que sur le muscle soléaire. Pour le premier muscle, elle est d'environ dix minutes, alors que pour le second, elle est supérieure à 35 minutes.

Explication de cette différence de sensibilité: la potentialisation des contractions par les organophosphorés est liée à l'inhibition des ChE, c'est-à-dire à la persistance de l'ACh au niveau des récepteurs de la plaque. On obtient des contractions de type tétanique, d'amplitude supérieure à la normale. Nous avons vérifié le seuil tétanique des muscles tibial et soléaire de Chat (Figure 17).

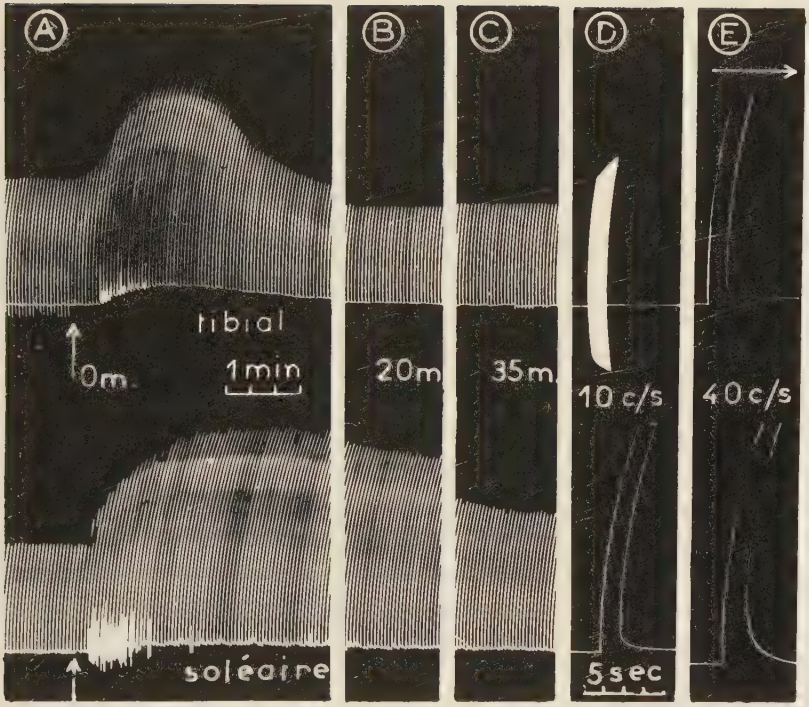


Figure 17: *Action potentialisatrice aes contractions par le 8061 HC sur la préparation nerf sciatique – muscles tibial antérieur et soléaire de Chat.*
à t = 0 min. *8061 HC* *5 mg/kg*
(Cliché réduit aux 2/3)

Pour une fréquence de 10 cycles par seconde, le soléaire répond par un tétanos soutenu, alors que le tibial continue à suivre le rythme de la stimulation. Ce dernier ne répond par un tétanos complet qu'à partir de 40 cycles par seconde. Le seuil tétanique du soléaire est donc quatre fois inférieur à celui du tibial, et ceci explique l'action plus prononcée du 8061 HC sur ce premier muscle.

2) Thionophosphates: action d'une dose minimale potentialisatrice maximale.

a) Chez le Rat.

∝) 7900 HC, 8059 HC et 8014 bis HC:

Ces trois produits, isomères respectifs des 7901 HC, 8063 HC et 8014 HC, sont inactifs sur la préparation nerf – muscle de Rat. Les doses essayées sont les suivantes:

– 7900 HC : de 5 à 500 mg/kg,

FORMULE				NO CONV. H.C.	DOSE MIN. POTENT. MAX.		
					mg/kg	latence	durée
Générale	Y	Z	R			minutes	
$CH_3-O-\underset{Z}{\overset{\|}{P}}-Y-CH_3$ / $CH_3-O-\underset{Z}{\overset{\|}{P}}-O-R$	O	S	$-CH_3$	7900	INACTIF		
	S	O		7901	250	50	>120
	O	S	$-C_6H_4-NO_2$	8056	4	6	>120
	S	O		8061	3	1	35
	O	S	$-C_6H_3(CH_3)-NO_2$	8057	30	7	>120
	S	O		8062	20	1	35
$CH_3-O-\underset{Z}{\overset{\|}{P}}-S-R$ / CH_3-Y-CH_3	O	S	$-CH(CH_2-COO-Et)-COO-Et$	8059	INACTIF		
	S	O		806,3	5	1	35
	O	S	$-CH_2-CO-NH-CH_3$	8014 bis	INACTIF		
	S	O		8014	35	2	60
$(C_2H_5O)_2-\overset{O}{\overset{\|}{P}}-O-C_6H_4-NO_2$				PARAOXON	0,40	1	>120
$(C_2H_5O)_2-\overset{O}{\overset{\|}{P}}-O-\overset{O}{\overset{\|}{P}}-(OC_2H_5)_2$				T.E.P.P	0,16	1	>120

Tableau XVI: *Doses minimales potentialisatrices maximales sur la préparation nerf – muscle de Rat. Caractéristiques de la potentialisation: temps de latence et durée d'action.*

– 8059 HC : de 5 à 500 mg/kg,
– 8014 bis HC : de 2 à 400 mg/kg.

Des doses supérieures sont mortelles.

β) 8056 HC et 8057 HC:

Ces dérivés, isomères respectifs des 8061 HC et 8062 HC, sont les seuls thionophosphates –parmi les cinq de la série étudiée– à posséder une activité au niveau de la jonction myoneurale. Après l'administration d'un de ces deux produits, les effets enregistrés sont identiques à ceux que nous avons décrits pour les composés thiolos. La seule variante est le facteur temps: latence et durée d'action. En effet, après l'injection d'un de ces dérivés, une période de latence de six à sept minutes s'écoule

avant d'obtenir une augmentation d'amplitude des contractions (Figures 15 et 22). Sur la Figure 15, on peut suivre l'apparition des fasciculations musculaires, conjointement au début de la phase potentialisatrice; l'enregistrement à vitesse rapide permet de constater leur fréquence d'apparition. L'amplitude des contractions est maximale 15 à 20 minutes après l'injection et demeure stable pendant une période très prolongée: le temps nécessaire pour que les contractions reviennent à leur valeur initiale est de deux heures et plus. Les D.Min.P.Max. du 8056 HC et du 8057 HC sont respectivement de 4 et 30 mg/kg.

Les résultats figurent dans le Tableau XVI.

b) Action du 8056 HC chez le Lapin (Figure 31).

Sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Lapin et après administration du 8056 HC à une dose de 5 mg/kg, on observe les effets suivants:
après une période de latence de cinq à sept minutes, la phase potentialisatrice des contractions apparait lentement et le tonus musculaire diminue légèrement. Cependant, la potentialisation n'est jamais importante, ni en amplitude, ni en durée: en effet, l'amplitude des contractions est à peine supérieure à 50 p. 100 par rapport à celle des contractions normales et la phase potentialisatrice ne dure que quelques minutes (15 à 20 minutes).

3) **Substances de référence**: Para-oxon (P.–O.) et tétraéthylpyrophosphate (TEPP).

L'emploi du Para-oxon comme substance de référence permet, grâce à sa parenté de structure avec les dérivés étudiés, des comparaisons qualitatives d'activité; le TEPP, plus connu et beaucoup mieux étudié, est surtout utilisé pour des comparaisons d'ordre quantitatif.

Après injection d'une D.Min. P. Max., la période de latence qui s'écoule avant les fasciculations musculaires et la potentialisation des contractions est réduite au temps circulatoire ([1]). Les contractions atteignent rapidement une amplitude maximale ou un plateau qui se maintient pendant plusieurs heures. Ces deux substances s'apparentent donc à la fois aux composés thiolos par le temps de latence et aux thionophosphates actifs par la durée d'action. Les D.Min.P.Max. respectives du TEPP et du Para-oxon sont respectivement de 0,16 et 0,4 mg/kg.

Les résultats expérimentaux figurent dans le Tableau XVI.

4) **Actions propres communes aux thiono- et aux thiolophosphates.**

Ces dérivés phosphorés, à des D.Min.P.Max., possèdent des actions propres communes, indépendantes de celles qui se manifestent au niveau de la jonction neuromusculaire. Ainsi, pa-

(1) Temps circulatoire: temps mis par le sang à parcourir complètement le circuit vasculaire.

rallèlement à l'apparition des fasciculations et de la potentialisation des contractions, on observe les effets suivants:

a) sialorrhée:

Chez le Rat, le volume des secrétions est proportionnel à la dose. Il est de quelques dizièmes de millilitres pour une D.Min.P.Max., et d'environ 0,5 ml pour une dose double. Chez le Lapin, le volume des secrétions salivaires semble être indépendant de la dose injectée (à la condition que cette dose soit égale ou supérieure à la dose maximale), puisque pour 5, 10 et 20 mg/kg du 8061 HC, il varie entre 8,5 et 9,6 ml.

L'ensemble des résultats est exposé à la page 150.

b) lacrymation:

Chez le Rat, cette lacrymation est souvent "sanglante", signe d'une inhibition importante des ChE. Cette sécrétion de larmes colorées en rouge par la protoporphyrine et la coproporphyrine constitue le phénomène de chromodacryorrhée et résulte de l'action de produits muscariniques (BURGEN [1949a]).

c) défécation:

La défécation est fréquente après l'injection d'une dose active de produit. L'administration de doses successives ou de fortes doses peut conduire, chez le Lapin, à une véritable diarrhée. Des émissions d'urines sont rares.

d) pression artérielle (Figure 18):

Pour tous les dérivés actifs (sauf le 7901 HC), on obtient, chez le Rat, une très forte hypertension qui se manifeste parallèlement à la potentialisation musculaire. Les actions cardiovasculaires sont décrites à la page 157.

Les actions propres communes des thionos et des thiolos, mises à part les actions pressives, sont identiques chez le Chat et le Lapin. Chez le Lapin, en effet, après injection d'un thiolo (8061 HC), on observe une légère hypotension (baisse d'environ deux cm de mercure); elle est cependant transitoire et la forme de la courbe hypotensive, bien que de sens opposé, est semblable à celle de la potentialisation des contractions musculaires.

5) Proportionnalité dose-activité. Sommation des doses.

Il est difficile de saisir une proportionnalité entre la dose de l'organophosphoré et l'effet observé sur la préparation nerf – muscle, car elle n'existe que pour une zone restreinte, c'est-à-dire entre deux doses souvent très rapprochées: la dose maximale inactive et la dose minimale potentialisatrice maximale (voir Figure 14 et page 111).

a) doses infraliminaires:

Après administration d'une dose inactive sur la préparation neuromusculaire, aucune manifestation d'ordre parasympathicomimétique n'apparait: il n'y a ni lacrymation, ni sialorrhée, ni défécation. De plus, la pression artérielle n'est pas modifiée.

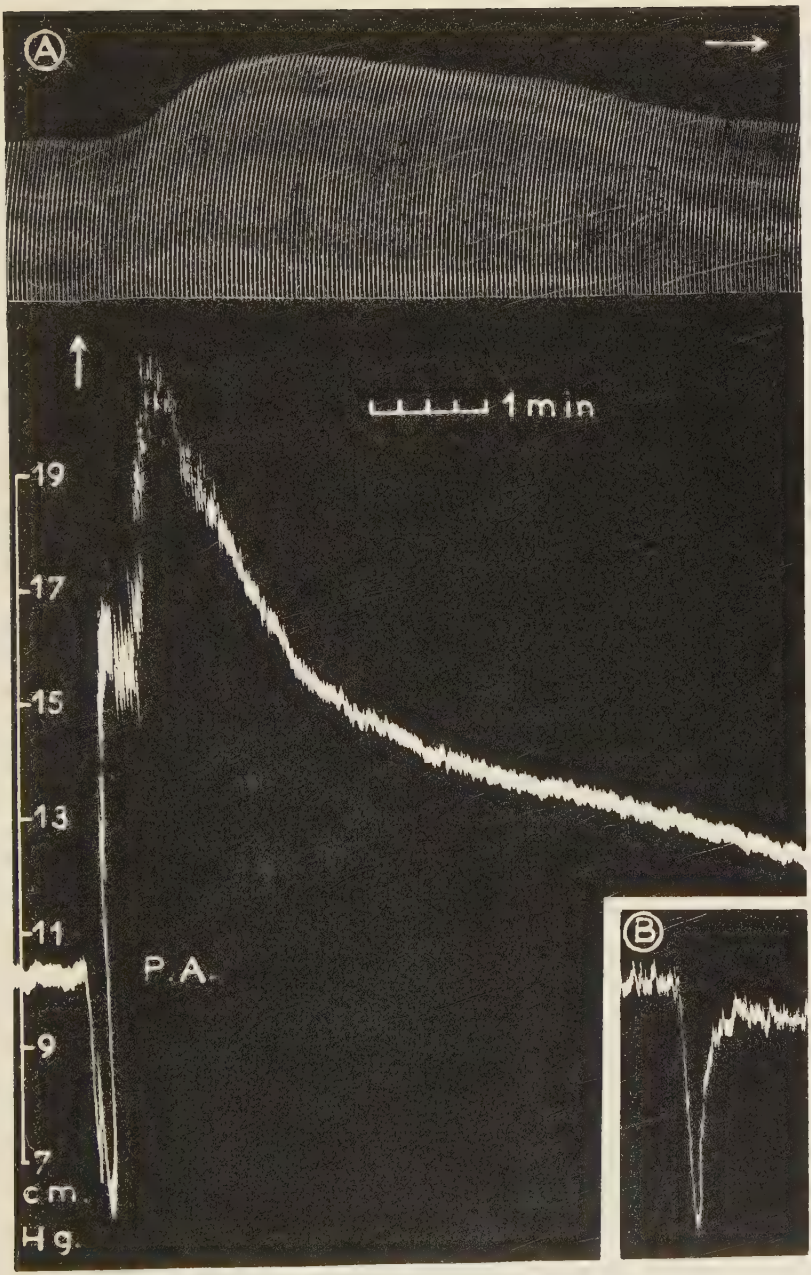


Figure 18: *Action sur la pression artérielle et action potentialisatrice des contractions sur la préparation nerf sciatique — muscle tibial antérieur de Rat.*
En A: à ↑, 8063 HC 5 mg/kg
En B: action propre du solvant: 0,1 ml d'éthanol à 95°.
(Cliché réduit aux 3/4)

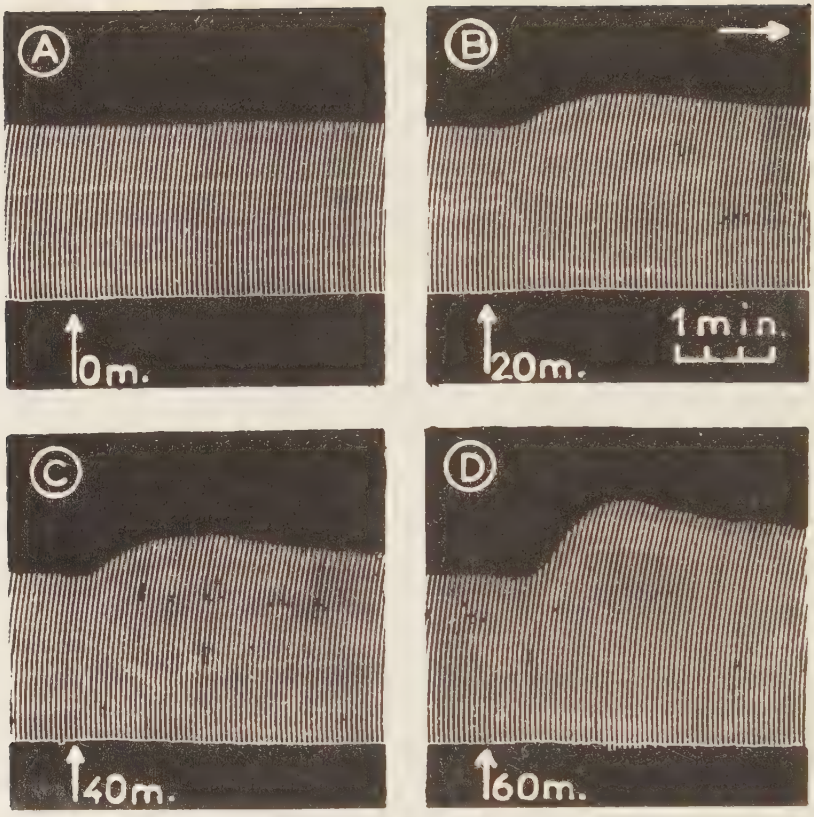


Figure 19: *Phénomène de sommation des doses successives sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En A, B, D et D: à ↑ 8063 HC 2,5 mg/kg

(Cliché réduit aux 4/5)

Si on injecte une dose inactive à des intervalles de temps déterminés, on obtient, après un certain nombre d'injections, une action potentialisatrice faible, dont l'amplitude augmente de plus en plus, à mesure que des doses ultérieures (inactives par elles-mêmes) sont administrées à l'animal. Dans la Figure 19, une première dose de 2,5 mg/kg du 8063 HC est sans action, alors qu'une seconde injectée 20 minutes plus tard, potentialise de 18 p. 100 les contractions musculaires; cette augmentation est de 27 et de 50 p. 100 après une troisième et une quatrième dose, Si on poursuit les injections, il arrive un moment où la potentialisation des contractions devient maximale. Cette sommation des doses résulte d'une accumulation de produit, c'est-à-dire d'une in-

hibition de plus en plus grande des ChE. On l'obtient pour les dérivés thiolos et thionos. L'administration, toutes les 45 minutes par exemple, d'un thionophosphate comme le 8056 HC à une dose de 1 mg/kg, n'entraine aucune action pour les première et deuxième doses; à partir de la troisième, la potentialisation est de 30 p. 100, alors qu'elle est de 54 p. 100 après une quatrième.

Cette sommation des doses facilite la recherche de la D.Min.P.Max. En effet, prenons l'exemple d'un thiolophosphate. On sait que, pour une dose active, la période de latence de ces produits est réduite au temps circulatoire. On injecte donc toutes les deux minutes une faible dose de produit. On suit sur la contraction musculaire l'effet de sommation. A partir d'une certaine concentration, de nouvelles augmentations d'amplitude s'observent pour chaque dose administrée, jusqu'à ce qu'on obtienne la potentialisation maximale. L'addition de chaque dose nous renseigne sur la valeur de la D.Min.P.Max., que l'on vérifie par de nouvelles expériences sur plusieurs animaux différents. Pour les thionophosphates, on procède de la même façon, mais un temps plus prolongé (dix minutes par exemple) doit séparer chaque injection, puisque ces dérivés ne manifestent une action potentialisatrice sur les contractions qu'après un temps de latence de quelques minutes.

b) doses submaximales:

Lors de l'administration à un animal d'une dose liminaire, on obtient une faible potentialisation des contractions. On observe également des fasciculations musculaires, une légère hypertension mais, rarement, les phénomènes de sialorrhée, de lacrymation et de défécation. Dans le cas des thionophosphates, la période de latence est considérablement augmentée.

c) doses maximales (D.Min.P.Max.):

Nous avons décrit précédemment (pages 101 et 105) les effets neuromusculaires (et autres) qui se manifestent après l'injection d'une D.Min.P.Max. d'un dérivé thiono ou thiolo. La Figure 15 permet de comparer graphiquement les différences (latence et durée d'action) entre la potentialisation du 8057 HC et celle de son isomère, le 8062 HC.

Après récupération complète de l'amplitude initiale des contractions, on observe, lors de l'injection d'une seconde dose, la répétition des mêmes actions. Celles-ci sont qualitativement identiques. Cependant, le temps de latence des thionos est diminué et la durée de la potentialisation est augmentée, mais cette prolongation n'est pas toujours très importante. La lacrymation et la sialorrhée se manifestent avec plus d'intensité, pendant une durée plus grande.

Il n'y a proportionnalité entre la dose administrée et les

Numéro conventionnel H.C.	Dose maximale inactive mg/kg	Dose minimale potentialisatrice maximale mg/kg	Proportionnalité dose-activité pour une variation de
TEPP	0,03	0,165	0,135 mg/kg
Para-oxon	0,1	0,4	0,3 mg/kg
8061	1	3	2 mg/kg
8056	1	4	3 mg/kg
8063	2,5	5	2,5 mg/kg
8062	6	20	14 mg/kg
8057	20	30	10 mg/kg
8014	15	35	20 mg/kg

Tableau XVII: *Relations entre la dose minimale potentialisatrice maximale et la zone pour laquelle les effets neuromusculaires (préparation nerf sciatique – muscle tibial de Rat) sont proportionnels à la dose administrée.*

effets observés que pour la zone comprise entre la dose maximale inactive et la dose minimale potentialisatrice maximale (voir page 108). Comme le Tableau XVII permet de le constater, cette zone de proportionnalité est d'autant plus restreinte que le composé est plus actif.

Nous avons vu (page 58) qu'il n'y a aucune proportionnalité entre l'intensité des symptômes toxicologiques et le pourcentage d'inhibition des cholinestérases sanguines. Ceci se vérifie également pour l'action neuromusculaire: chez le Lapin, la potentialisation des contractions est maximale pour une dose de 5 mg/kg du 8061 HC, bien que l'inhibition des acétylcholinestérases soit alors inférieure à 10 p. 100. Pour une dose quatre fois supérieure, l'inhibition est inférieure à 40 p. 100 (page 44).

d) doses supramaximales:

Pour des doses supérieures à la D.Min.P.Max. ou supramaximales, il n'y a pas proportionnalité dose-activité sur la préparation neuromusculaire, si ce n'est, comme nous venons de le mentionner, sur le temps de latence et la durée de la potentialisation. L'amplitude des contractions atteint un sommet ou plateau qui ne peut être dépassé, malgré de nouvelles injections de produit: les actions demeurent qualitativement et presque quantitativement les mêmes pour des doses plusieurs fois supérieures à la D.Min.P.Max. Pour les thiolos, le temps de latence est pratiquement nul, puisque le début de la phase potentialisatrice se manifeste après la première ou la seconde contraction; pour les

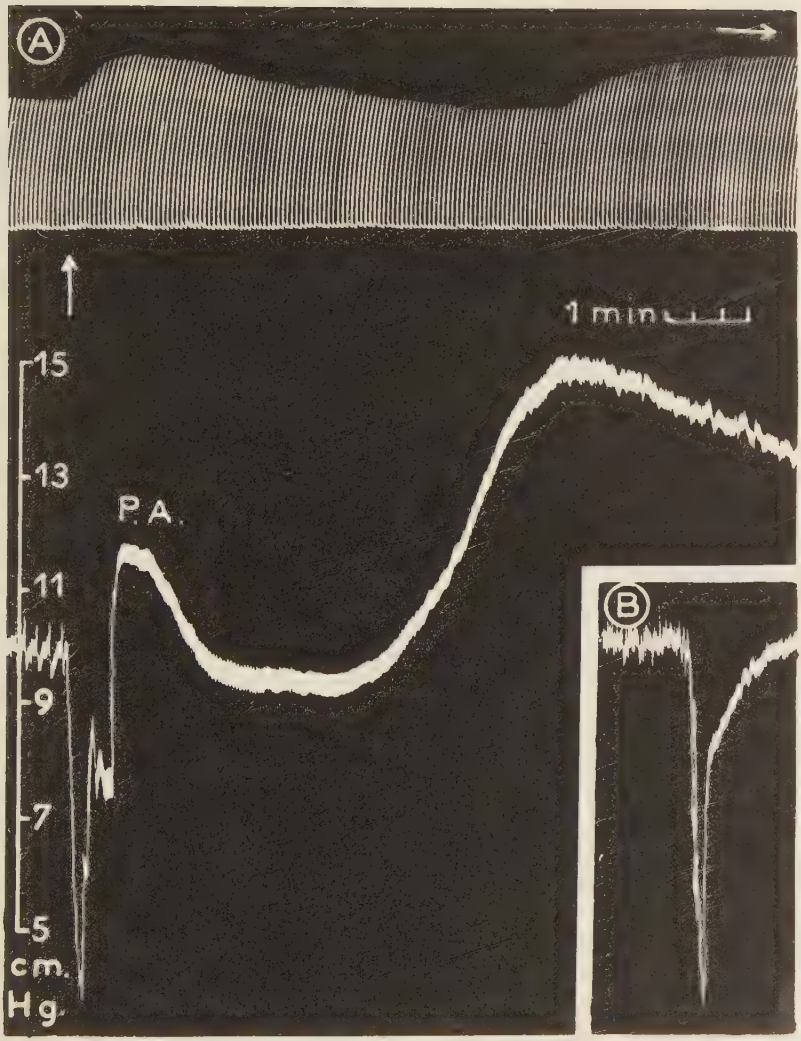


Figure 20: *Action triphasique artérielle et musculaire (préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat) par une forte dose de 8061 HC.*

En A: à ↑ 8061 HC 30 mg/kg
(une heure auparavant, l'animal avait reçu la même dose de produit).
En B: action propre du solvant: 0,1 ml d'éthanol à 95°.

(Cliché réduit aux 3/4)

thionos, cette latence est également diminuée de quelques minutes, mais elle n'est jamais réduite au temps circulatoire: le temps de latence d'une dose de 12 mg/kg du 8056 HC (trois fois la D.Min.P.Max.) est de quatre minutes.

A très fortes doses (l'activité des ChE étant presque totalement supprimée et l'ACh, par suite de son accumulation et de la persistance de ses effets au niveau de la plaque, entrainant un blocage neuromusculaire), on obtient un enregistrement triphasique des contractions (Figure 20):
après une phase potentialisatrice transitoire (première phase), l'amplitude des contractions diminue peu à peu (seconde phase), se stabilise puis augmente de nouveau (repotentialisation: troisième phase). Les fasciculations, la salivation, la sialorrhée et l'hypertension artérielle même suivent exactement l'amplitude des contractions: elles apparaissent au moment de la première phase de potentialisation, cessent pendant la phase décroissante et réapparaissent lors de la repotentialisation des contractions.

L'examen de l'enregistrement de quelques expériences nous a amené à nous demander si la diminution d'amplitude des contractions musculaires ne résulterait pas de la très forte hypotension, diminuant l'irrigation du muscle. D'autres expériences nous montrèrent cependant que la diminution d'amplitude des contractions (seconde phase) se produisait même si la pression artérielle descendait à un niveau à peine inférieur à celui de la pression normale (Figure 20).

Cependant, deux faits doivent être mentionnés:

α) sauf pour le TEPP, nous n'avons pas obtenu, lors de la seconde phase, une décroissance des contractions jusqu'à une amplitude inférieure à l'amplitude initiale. Seule une dose de 1,32 mg/kg de TEPP (correspondant à huit fois la D.Min.P.Max.) nous a donné, pendant la seconde phase, une diminution d'environ 45 p. 100 par rapport à l'amplitude normale des contractions.

β) cette action triphasique n'a été mise en évidence qu'avec quelques uns de ces dérivés (8056 HC, 8061 HC, 8014 HC). Pour les autres, comme le 8063 HC par exemple, nous n'avons pu reproduire ce phénomène, même à une dose de 45 mg/kg (soit neuf fois la D.Min.P.Max.); par contre, 40 mg/kg du même produit, injectés en doses fractionnées (Figure 21), entrainent une cassure dans la courbe, partiellement comparable à celle de l'action triphasique, mais beaucoup plus fugace.

Il est beaucoup plus facile d'obtenir une action triphasique si l'animal a été sensibilisé par une dose précédente (Figure 20) ou si on injecte une seconde dose de produit (Figure 21) pendant la phase de potentialisation provoquée par une première dose.

Il est très difficile de déterminer les doses pour lesquelles cette action apparait, car elle survient pour des doses sou-

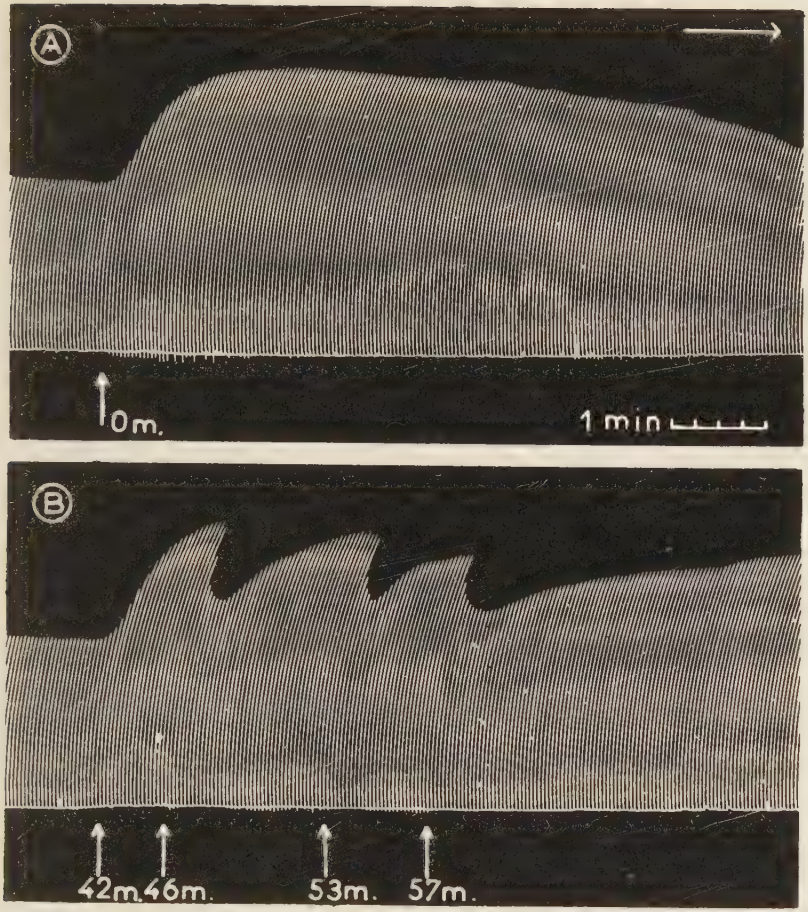


Figure 21: *Action de fortes doses successives de 8063 HC sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En A: à t = 0 min. 8063 HC 20 mg/kg
En B: à t = 42, 46, 53 et 57 min. 8063 HC 10 mg/kg

(Cliché réduit aux 3/4)

vent voisines de la dose mortelle. Le phénomène de sommation ne fait d'ailleurs que compliquer davantage cette détermination. En guise de démonstration, nous donnerons les résultats de quelques expériences réalisées à ce sujet. Nous indiquerons les doses administrées avec, entre parenthèse, le temps en minutes (la première dose étant injectée au temps 0 minute); la dose entrainant l'action triphasique est soulignée d'un trait et, entre crochets, fi-

gure la quantité totale de produit administré à l'animal avant d'obtenir cette action.

8056 HC:	2 mg/kg (0); 4 mg/kg (20); 6 mg/kg (120)	[12 mg/kg]
8061 HC:	2 mg/kg (0, 30); 4 mg/kg (80); 8 mg/kg (110)	[16 mg/kg]
	3 mg/kg (0); 6 mg/kg (60); 12 mg/kg (105)	[21 mg/kg]
	30 mg/kg (0); 30 mg/kg (60)	[60 mg/kg]
	45 mg/kg (0); 30 mg/kg (60)	[75 mg/kg]
	60 mg/kg (0)	[60 mg/kg]
8063 HC:	3 mg/kg (0, 8, 16, 20); 5 mg/kg (28, 32, 36, 40)	[32 mg/kg]
	20 mg/kg (0); 10 mg/kg (42); 10 mg/kg (46)	[40 mg/kg]
	40 mg/kg (0, 45); 20 mg/kg (60)	[100 mg/kg]

Sauf pour le 8063 HC, chaque dose a été injectée lorsque l'amplitude des contractions, augmentée par une dose précédente, avait récupéré sa valeur normale. On voit donc que ces résultats sont très discordants, ce qui rend difficile toute détermination précise de la dose à action triphasique.

Chez le Lapin, sur la préparation nerf sciatique – tibial antérieur, le seul thiolophosphate étudié fut le 8061 HC. Ici encore, des résultats discordants ont été obtenus:

– chez un animal, par exemple, pour des doses de 5, 10, 15 et 20 mg/kg, injectées à 30 minutes d'intervalle, le seul phénomène observé fut la potentialisation des contractions.

– chez un autre animal, après l'administration d'une dose de 15 mg/kg du 8061 HC, 45 minutes après une première dose de 5 mg/kg, nous avons obtenu une brève phase de potentialisation, suivie d'une décroissance rapide puis d'une suppression complète des contractions pendant une quinzaine de minutes. Quatre-vingt-dix minutes après l'injection, l'amplitude des contractions est encore 50 p. 100 inférieure à la valeur normale.

6) Essai d'interprétation des résultats. Relations structure-activité.

En fonction des résultats obtenus, surtout sur la préparation neuromusculaire de Rat, nous essayerons de dégager les différences majeures entre les thiolophosphates et les thionophosphates. Nous ferons cependant, en premier lieu, un bref rappel des actions de chacun des groupes.

a) Thiolophosphates: 7901 HC, 8061 HC, 8062 HC, 8063 HC, 8014 HC.

L'action de ces dérivés se manifeste immédiatement après l'injection par une potentialisation des contractions, de durée assez courte (environ 30 minutes). Le 7901 HC se distingue de

ses homologues par le fait qu'une très forte dose est nécessaire pour potentialiser les contractions. Cette augmentation d'amplitude apparait après un très long temps de latence (50 minutes) et est durable (plusieurs heures).

Si on prend la D.Min.P.Max. comme indice d'activité et qu'on classe ces dérivés en fonction d'un ordre décroissant d'activité, on a:

8061 HC > 8063 HC > 8062 HC > 8014 HC > 7901 HC

Ces composés sont respectivement 18, 31, 125, 218 et 1.550 fois moins actifs que le TEPP, ainsi que 7, 12, 50, 87 et 600 fois moins que le Para-oxon (P.–O.)

La substitution d'un hydrogène sur le radical paranitrophényle du 8061 HC par un méthyle (8062 HC) diminue de sept fois l'activité sur la préparation neuromusculaire. De même, la substitution du radical paranitrophényle par:

– une chaine thio-alcoyle modifie considérablement (8014 HC) ou non (8063 HC) l'activité de la molécule.

– un alcoyloxy (7901 HC) supprime presque toute activité au niveau de la jonction myoneurale.

Si on compare l'action du 8061 HC sur le tibial antérieur de Chat, de Lapin et de Rat, on en déduit que la sensibilité des trois espèces est comparable: après une période de latence –qui se réduit au temps circulatoire–, l'amplitude des contractions augmente rapidement. Par contre, des différences existent, notamment sur:

– le tonus musculaire:
  – Rat : inchangé
  – Chat : augmenté,
  – Lapin : diminué.
– la durée d'action (valeurs moyennes):
  – Rat : 35 minutes,
  – Chat : 10 à 15 minutes,
  – Lapin : 15 à 20 minutes.

b) Thionophosphates.

Les 7900 HC, 8059 HC et 8014 bis HC, même à doses très fortes –plusieurs centaines de mg/kg–sont inactifs. Seuls les dérivés thionos à chaine paranitrophényle (8056 HC et 8057 HC) sont actifs. Après une période de latence de six à sept minutes, l'amplitude des contractions augmente rapidement et la phase de potentialisation se maintient pendant un temps très prolongé (supérieur à deux heures). La longue durée de la phase potentialisatrice par le 8056 HC (4 mg/kg) et le 8057 HC (30 mg/kg) n'est pas due à l'injection d'une trop forte dose de l'un de ces dérivés; en effet, comme on peut le constater sur la figure 14,

des doses inférieures ne déterminent pas une augmentation maximale de l'amplitude des contractions.

Si on classe le 8056 HC et le 8057 HC par ordre d'activité décroissante (D.Min.P.Max. croissante), on a:

8056 HC > 8057 HC

Ces composés sont respectivement 24 et 181 fois moins actifs que le TEPP, ainsi que 10 et 75 fois moins que le Para-oxon. La substitution d'un hydrogène par un méthyle (8057 HC) sur le radical paranitrophényle du 8056 HC diminue de sept fois l'activité du premier: ce facteur de perte d'activité est identique à celui de leur isomère thiolo.

Si on compare l'action du 8056 HC sur le muscle tibial antérieur de Lapin et de Rat, on conclut que la sensibilité de ces deux espèces est comparable: après une période de latence de plusieurs minutes, la valeur des contractions augmente. Cependant, les deux actions se différencient, en particulier sur:

- le tonus musculaire:
  - Rat : inchangé,
  - Lapin : diminué.
- la durée d'action:
  - Rat : supérieure à deux heures,
  - Lapin : 15 à 20 minutes.

Nous nous sommes posé la question de savoir si la période de latence observée avec les thionophosphates ne résultait pas du temps nécessaire à la solubilisation du produit dans le sang. Trois séries de faits nous ont fait conclure qu'il n'y avait aucun lien entre la solubilité des thionos et la période de latence observée:

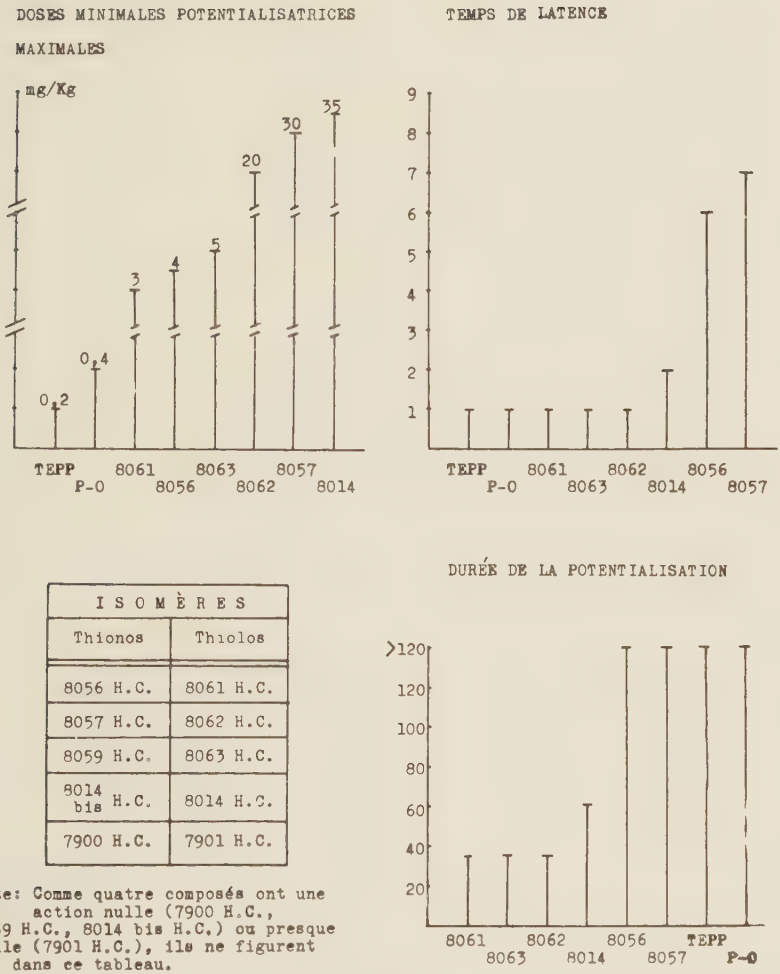
α) si le 8056 HC, dissout dans 0,1 ml d'éthanol à 95°, précipite lorsque la solution alcoolique est mélangée au soluté physiologique, par contre, on obtient une émulsion lorsque le 8057 HC est placé dans les mêmes conditions et le temps de latence observé est identique dans les deux cas. Par ailleurs, pour le 8062 HC, dérivé thiolophosphate injecté également sous forme d'émulsion, la période de latence est réduite au temps circulatoire.

β) après injection intra-artérielle proche du muscle, le 8056 HC en solution aqueuse est sans action sur la préparation neuromusculaire (Figure 31).

φ) la période de latence du 8056 HC est identique chez le Lapin et chez le Rat, même si, chez le premier, le volume de sang susceptible de solubiliser le produit est, proportionnellement, plus important que chez le Rat.

c) Classification et comparaison.

Dans le Tableau XVIII, nous avons classé tous les dérivés actifs –les thiolos, les thionos, le TEPP et le Para-oxon



I S O M È R E S	
Thionos	Thiolos
8056 H.C.	8061 H.C.
8057 H.C.	8062 H.C.
8059 H.C.	8063 H.C.
8014 bis H.C.	8014 H.C.
7900 H.C.	7901 H.C.

Note: Comme quatre composés ont une action nulle (7900 H.C., 8059 H.C., 8014 bis H.C.) ou presque nulle (7901 H.C.), ils ne figurent pas dans ce tableau.

Tableau XVIII: *Comparaison de la potentialisation des contractions obtenue par les thiono– et les thiolophosphates sur la préparation neuromusculaire de Rat.*

(P.–O.)– en fonction de

– la dose, par ordre d'activité décroissante du composé,

– la période de latence nécessaire à l'obtention de la phase potentialisatrice des contractions,

– la durée de la potentialisation des contractions musculaires.

Cette classification permet de conclure qu'il n'y a aucun rapport entre la dose et le temps de latence ou la durée de la potentialisation. Par contre, pour les thiophosphates, la durée d'action est directement proportionnelle au temps de latence (le TEPP et le

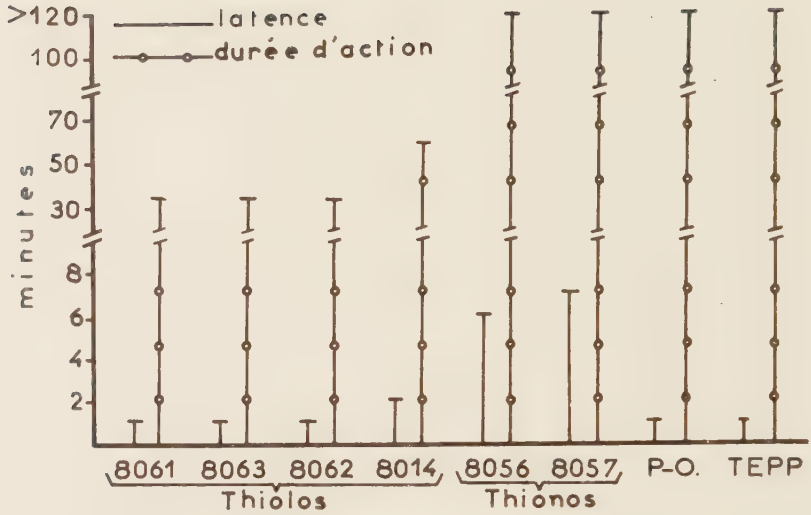


Tableau XIX: *Comparaison entre la période de latence et la durée de la potentialisation (durée d'action) des thionophosphates et des thiolophosphates sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

Para-oxon ayant une action intermédiaire). Pour les thiolos, la période de latence entre le moment de l'injection et la potentialisation des contractions est pratiquement nulle et la durée d'action est assez brève; pour les thionos, le temps de latence est beaucoup plus long et la durée de la phase potentialisatrice est très prolongée, ce qui est mis en évidence par le Tableau XIX.

II°– ACTION PROPRE À HAUTE FRÉQUENCE DE STIMULATION

A une inhibition de plus en plus grande des ChE correspond une diminution parallèle de la capacité du muscle à soutenir un tétanos. Sur une préparation neuromusculaire traitée par un antiChE, l'inhibition de WEDENSKY (1) apparait donc pour des fréquences beaucoup plus basses que sur une préparation normale. Ceci se vérifie tant *in situ* sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat qu'*in vitro* sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat.

1) Préparation nerf – muscle *in situ*.

Chez l'animal témoin ou normal, si on excite le nerf à une fréquence de

– 10 stimulus par seconde, le muscle répond par un tétanos incomplet: c'est le seuil tétanique.

(1) Voir page 76.

– 30 stimulus par seconde, le tétanos est complet ou presque.
– 50 stimulus par seconde, le tétanos est complet.

La préparation est stimulée à haute fréquence pendant cinq secondes; une période de 30 secondes sépare chaque série de stimulations. Dans l'intervalle de chaque groupe de tétanos, on excite normalement à une fréquence de six stimulus par minute.

Nous avons utilisé des doses inférieures, égales ou supérieures à la D.Min.P.Max., dans le but d'étudier l'inhibition de WEDENSKY en fonction de la dose et aussi de montrer les différences d'action entre les thionos et les thiolos. La Figure 22 permet de suivre la marche de l'expérience:
après enregistrement du groupe témoin des 3 tétanos (à t = –10 minutes), on injecte le composé thiono au temps 0 minute. On laisse agir pendant dix minutes puis on répète la série de tétanos. On suit l'évolution des courbes tétaniques dans le temps. Nous avons voulu suivre le même protocole avec les thiolos, mais en raison de la brève durée d'action de ces composés, nous avons dû stimuler à fréquences tétaniques cinq minutes seulement après l'administration du produit. Tous les dérivés thiolos (sauf le 7901 HC), les deux thionos actifs (8056 HC et 8057 HC), le TEPP et le Para-oxon ont été étudiés.

La différence essentielle entre l'inhibition de WEDENSKY pour les composés thiolos et thionos est la durée nécessaire à l'apparition puis à la disparition du phénomène (Figure 22). Le blocage neuromusculaire est d'autant plus complet que la dose administrée est plus grande et que la fréquence de stimulation est plus rapide. Pour tous les dérivés, l'inhibition de haute fréquence est donc influencée par les trois facteurs suivants: dose, temps et fréquence de stimulation.

a) doses infraliminaires:

Des doses inactives à basse fréquence de stimulation sur la préparation neuromusculaire ne modifient aucunement l'enregistrement des courbes tétaniques obtenues aux hautes fréquences de stimulation. L'inhibition de WEDENSKY n'apparait donc que pour des doses potentialisatrices des contractions.

b) doses maximales (D.Min.P.Max.) ou supramaximales:

∝) thionophosphates (Figure 22): la potentialisation des contractions débute quelques minutes après l'administration du produit. Dix minutes après l'injection, le blocage neuromusculaire est presque complet pour une fréquence de 50 cycles par seconde, mais, pour une stimulation de 30 cycles par seconde, il ne le devient que 30 minutes plus tard: c'est le temps nécessaire à l'inhibition maximale. La réponse du muscle pour des excitations moins rapides (10 cycles par seconde) est fortement diminuée, mais elle n'est jamais supprimée. Après 70 minutes, le

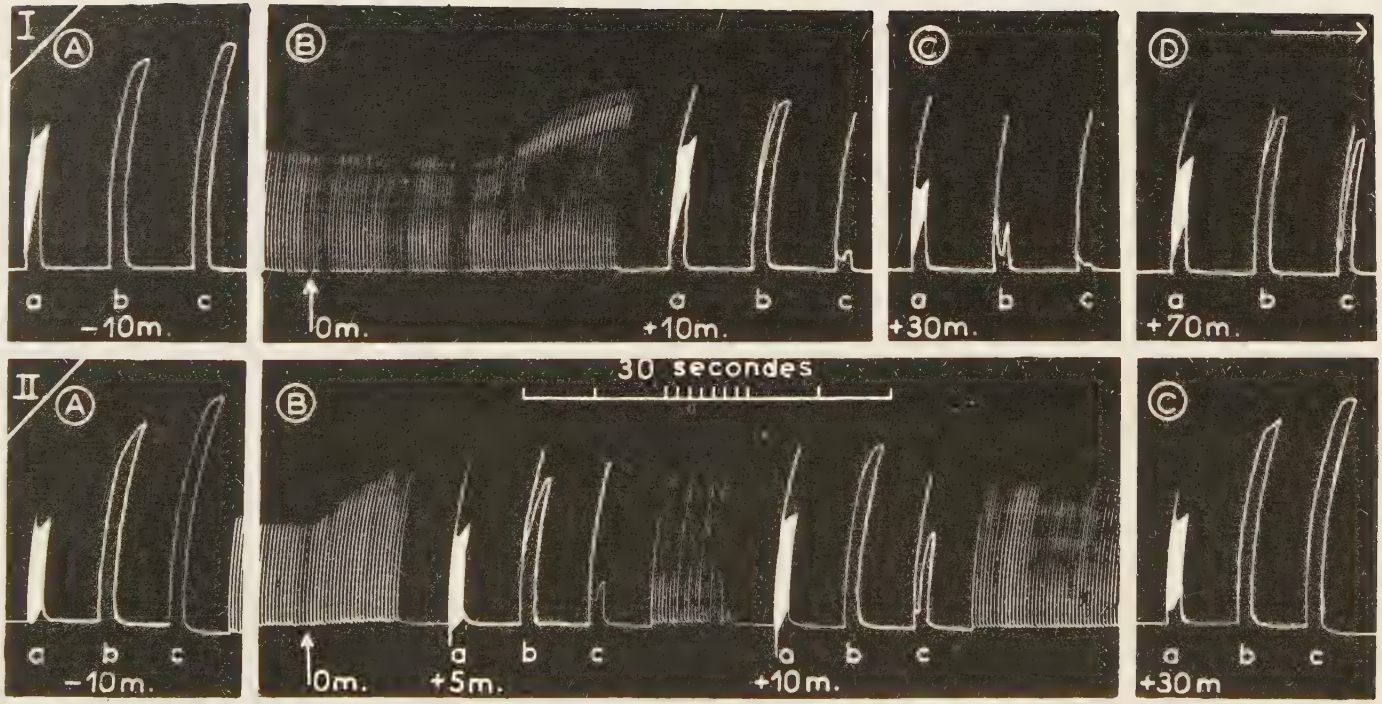


Figure 22: *Action d'un thionophosphate (8056 HC) et de son isomère thiolophosphate (8061 HC) à basse fréquence (6 cycles par minute) et à hautes fréquences de stimulation (10 [a], 30 [b] et 50 [c] cycles par seconde) sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En I: à t = 0 minute, 8056 HC 4 mg/kg
En II: à t = 0 minute, 8061 HC 3 mg/kg
(Cliché réduit aux 9/14)

blocage disparait partiellement et le muscle récupère peu à peu sa capacité de soutenir un tétanos, même si les contractions musculaires sont encore fortement potentialisées à basse fréquence de stimulation.

En résumé, le blocage neuromusculaire aux hautes fréquences de stimulation ne se manifeste que lentement et atteint son maximum (blocage complet) en 30 ou 40 minutes; la récupération s'amorce 60 à 80 minutes après l'injection pour être totale environ deux heures plus tard.

β) thiolophosphates (Figure 22): pour les thiolos, les phases successives que nous venons de décrire évoluent beaucoup plus rapidement, tellement vite même que la première série de tétanos doit être réalisée même si la contraction n'a pas encore atteint son amplitude maximale à basse fréquence de stimulation. L'inhibition de WEDENSKY est maximale cinq minutes après l'injection de l'inhibiteur, mais de fortes doses sont nécessaires pour réaliser un blocage complet. Ainsi, pour obtenir une inhibition totale de haute fréquence, il faut une dose de 20 mg/kg de 8063 HC, soit quatre fois la D.Min.P.Max. Pour des doses maximales, l'inhibition de WEDENSKY est souvent importante, mais elle n'est pas totale, même pour des fréquences de 50 cycles par seconde. De plus, la récupération s'amorce très rapidement, puisque 30 minutes après l'injection, le muscle peut soutenir parfaitement les contractures tétaniques obtenues pour de hautes fréquences de stimulation, même si les contractions obtenues à basse fréquence sont encore potentialisées.

φ) substances de référence: l'action des substances de référence est intermédiaire entre celle des thionos et celle des thiolos. En effet, le blocage se manifeste rapidement, mais persiste très longtemps: le Para-oxon et le TEPP, à des doses respectives de 0,4 mg/kg (D.Min.P.Max.) et 0,33 mg/kg (deux fois la D.Min.P.Max.), produisent un blocage complet presqu'instantanément pour des fréquences de 30 et 50 cycles par seconde. La récupération musculaire débute environ 40 minutes après l'injection et est complète deux heures plus tard.

2) Préparation nerf – muscle *in vitro.*

La préparation est stimulée à des fréquences de 25, 50 et 100 cycles par seconde pendant cinq secondes, avant comme après addition du produit au bain. Entre chaque série de tétanos, on stimule à six cycles par minute. Seuls les isomères thiolo (8061 HC) et thiono (8056 HC) ont été étudiés.

a) 8056 HC:

Ce dérivé, peu soluble dans l'eau, est solubilisé dans un volume suffisant de TYRODE; un volume identique à celui que l'on ajoute au bain est préalablement retiré afin de ne pas modifier le volume final de 100 ml.

A des concentrations variant entre 5 et 100 μg/ml, nous n'avons pu mettre en évidence aucune action de blocage neuromusculaire aux hautes fréquences de stimulation, même si le produit est laissé en contact de la préparation pendant un temps prolongé.

b) 8061 HC:

La Figure 23 montre la série de tétanos avant le produit, l'action propre du 8061 HC (à une concentration de 1 μg/ml) et, 40 minutes plus tard, la nouvelle série de tétanos. L'inhibition de WEDENSKY est importante, surtout pour les fréquences de 50 et 100 cycles par seconde. Le blocage se maintient dans le temps: 75 minutes après l'addition du 8061 HC, l'inhibition est encore complète. Cependant, des lavages successifs abondants permettent une récupération totale du muscle, mais elle est lente (environ une heure).

3) Essai d'interprétation des résultats (II).

De ces expériences, on peut faire les déductions suivantes:

a) l'inhibition de WEDENSKY est proportionnelle à la dose injectée, c'est-à-dire à l'inhibition des cholinestérases.

b) pour une dose donnée, le blocage neuromusculaire est d'autant plus complet que la fréquence de stimulation est plus élevée.

c) l'inhibition de haute fréquence n'apparaît qu'avec des doses qui potentialisent les contractions à basse fréquence de stimulation, mais l'inverse n'est pas vrai: en effet, pour une dose potentialisatrice des contractions à basse fréquence de stimulation, on n'obtient pas nécessairement une inhibition de WEDENSKY si on stimule par des hautes fréquences.

d) pour des dérives à action prolongée (Para-oxon, TEPP, 8056 HC et 8057 HC), une D.Min.P.Max. détermine une inhibition de WEDENSKY; le blocage est complet ou presque pour des fréquences de 25 et de 50 cycles par seconde. Pour les dérivés thiolos, dont la durée d'action est plus brève, des D.Min.P.Max. sont souvent inactives pour produire un blocage neuromusculaire; il faut alors utiliser des doses supérieures à la D.Min.P.Max.

e) avec les thiolophosphates, la récupération musculaire est complète au moment où le blocage neuromusculaire, sous l'action d'un thionophosphate, est total ou maximal.

f) *in vivo,* l'inhibition de haute fréquence disparaît avec le temps; *in vitro,* le muscle ne récupère sa capacité de soutenir un tétanos qu'après des lavages successifs et abondants de la préparation.

g) le 8061 HC a une action propre potentialisatrice des contractions *in vitro* et *in vivo* et il entraine, *in vitro,* une inhibition

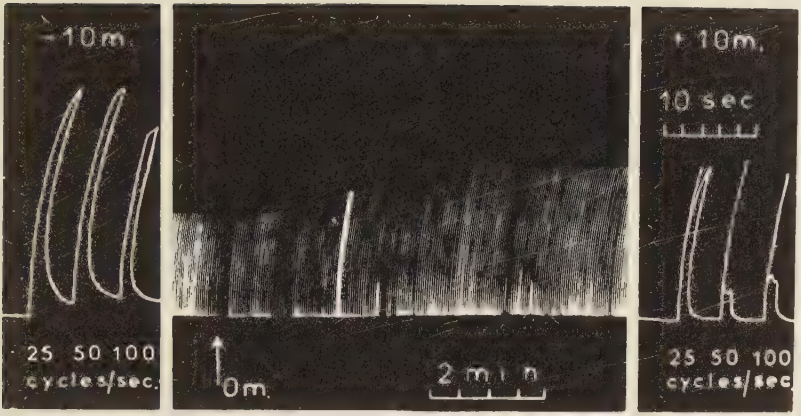


Figure 23: *Action d'un thiolophosphate à basse (6 cycles par minute) et à hautes fréquences de stimulation sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat.*

à t = 0 minute: 8061 HC 100 μg

(bain de 100 ml)

(Cliché réduit aux 3/5)

de haute fréquence. Par contre, le 8056 HC, dérivé thionophosphate, potentialise *in vivo* les contractions musculaires. *In vitro,* il est sans action propre et ne provoque aucune inhibition de WEDENSKY.

III°– ANTAGONISME *d*-TUBOCURARINE – ANTICHOLINESTÉSIQUES.

Les recherches d'actions antagonistes ont été réalisées avec les dérivés actifs sur la préparation neuromusculaire, excluant ainsi le 7900 HC, le 7901 HC, le 8059 HC et le 8014 bis HC. En raison du temps de latence des thionophosphates, seul le 8056 HC a été étudié parmi cette série d'homologues. Par contre, tous les thiolophosphates actifs (8061 HC, 8062 HC, 8063 HC, 8014 HC), ainsi que les deux substances de référence (Para-oxon et TEPP) ont été utilisés.

1) Antagonisme de la curarisation par les anticholinestérasiques.

a) <u>à titre curatif</u>:

L'action antagoniste de la curarisation par la *d*-tubocurarine (*d*-TC) qu'exercent les dérivés étudiés est fonction de la dose de l'antiChE administrée (Figure 24).

α) une dose infraliminaire n'antagonise pas la paralysie par la *d*-TC. La pente de la courbe et le temps nécessaire à la récupération complète ne sont pas modifiés.

β) pour des doses seuils ou submaximales, l'action est faible, souvent nulle. Ainsi, l'antagonisme du 8061 HC, du 8063

HC et du Para-oxon, à des doses respectives de 1, 3,5 et 0,1 mg/kg, est nul ou presque nul. Seule la pente de la courbe est un peu plus grande.

γ) pour des D.Min.P.Max., l'action antagoniste est nette: il y a cassure de la courbe et on récupère l'amplitude normale en quelques contractions. Ceci se vérifie avec tous les dérivés étudiés.

Avec le 8056 HC, un antagonisme aussi marqué ne put être démontré à cause de la période de latence particulière aux thionos. Nous avons alors procédé comme suit:
sur une préparation normale, l'injection de doses successives de *d*-tubocurarine entraine des curarisations de plus en plus intenses et prolongées. L'administration d'un éventuel antagoniste, juste après la deuxième dose de *d*-TC, doit, au contraire, conduire à une curarisation moins prolongée. Nous avons pu démontrer un antagonisme avec le 8056 HC, mais seulement avec des doses égales ou supérieures à la D.Min.P.Max. (4 mg/kg). Pour une telle dose, la durée de la curarisation par la *d*-TC diminue d'une dizaine de minutes.

Même si les dérivés ramènent très rapidement les contractions à leur amplitude initiale, celles-ci ne la dépassent jamais. De plus, aucune fasciculation musculaire, lacrymation, sialorrhée ou défécation n'apparaît.

δ) pour des doses supramaximales, l'action anticurare est encore plus nette; de plus, les contractions atteignent rapidement une valeur supérieure à la normale. L'action antagoniste est donc suivie d'une potentialisation des contractions, mais celle-ci est toujours faible. Ainsi (Figure 24 D), la curarisation est antagonisée par 20 mg/kg de 8063 HC (quatre fois la D.Min. P.Max.), mais l'amplitude des contractions est à peine augmentée de 10 p. 100 par rapport à la normale. Ici encore, on n'observe aucune fasciculation musculaire, sialorrhée, lacrymation ou défécation.

Si on répète plusieurs fois les actions anticurares avec de fortes doses d'antiChE, il arrive un moment où ces dérivés potentialisent en durée la paralysie par la *d*-tubocurarine.

b) à titre préventif (Figure 25):

Après curarisation par la *d*-TC et au moment de la reprise des contractions, l'administration d'une D.Min.P.Max. d'un dérivé ramène rapidement les contractions à la valeur initiale. On vérifie, avec la même dose de *d*-TC que précédemment, le temps nécessaire pour obtenir une paralysie identique à la première.

Sur la Figure 25, le 8063 HC, à une dose de 5 mg/kg (D.Min.P.Max.) joue le rôle d'antagoniste à titre curatif en B, mais à titre préventif en C et D. Cette propriété se retrouve avec tous les autres dérivés, pour des doses égales ou supérieures à

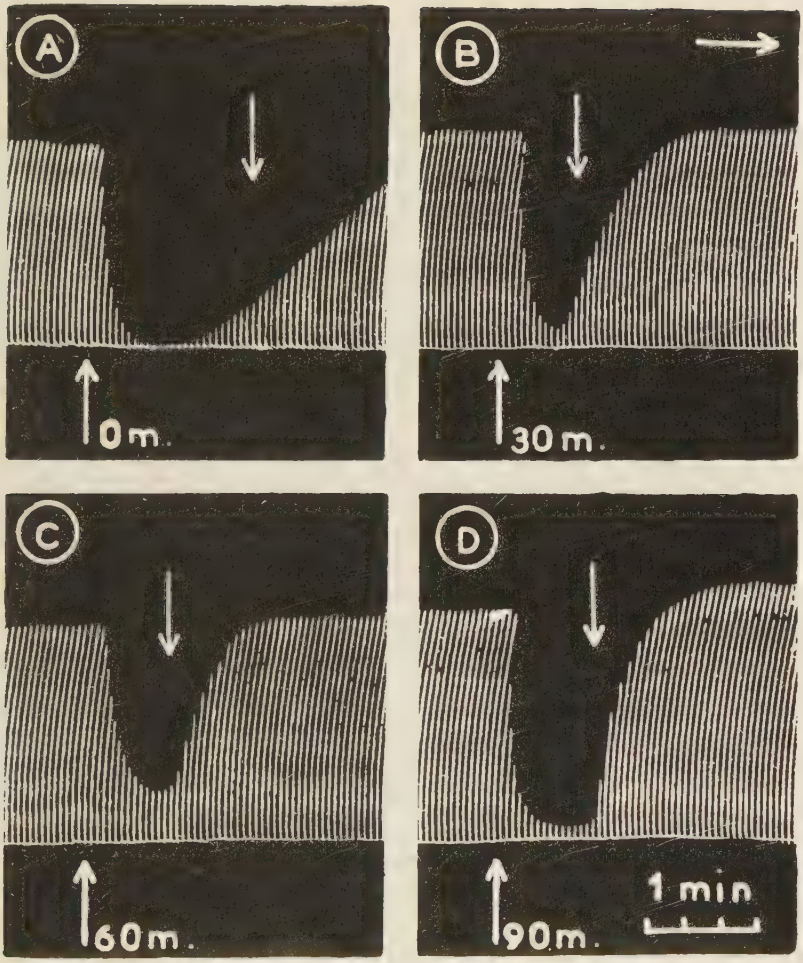


Figure 24: *Antagonisme à titre curatif de la curarisation par la* d-*tubocurarine qu'exerce le 8063 HC sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat..*

En A:	à ↑	*d*-tubocurarine	65	µg/kg
	à ↓	8063 HC	2,5	mg/kg
En B:	à ↑	*d*-tubocurarine	65	µg/kg
	à ↓	8063 HC	5	mg/kg
En C:	à ↑	*d*-tubocurarine	65	µg/kg
	à ↓	8063 HC	10	mg/kg
En D:	à ↑	*d*-tubocurarine	65	µg/kg
	à ↓	8063 HC	20	mg/kg

(Cliché non réduit)

la D.Min.P.Max., et s'explique par une action prolongée du produit. Ainsi, sans tenir compte du phénomène de sensibilisation à la *d*-TC, la curarisation n'atteint sa valeur initiale que 50 minutes après une dose de 5 mg/kg de 8063 HC.

D'autres expériences confirment ces résultats. Après paralysie complète (par 75 mg/kg de *d*-TC), on injecte (au temps 0 minute) 4 mg/kg de 8056 HC. Cinquante et soixante-dix minutes plus tard, on administre la même dose de *d*-TC. La diminution d'amplitude des contractions n'est respectivement que de 10 et 30 p. 100, alors qu'elle était de 100 p. 100 avant l'action de l'organophosphoré. L'action antagoniste persiste dans le temps, puis disparaît peu à peu.

2) Antagonisme des anticholinestérasiques par la *d*-tubocurarine.

a) <u>à titre curatif</u>:

La potentialisation des contractions musculaires est antagonisée par la *d*-tubocurarine; celle-ci supprime également les fasciculations musculaires. Nous avons déterminé la dose minimale de *d*-TC capable d'exercer cette action.

α) pour des doses curarisantes par elles-mêmes, chez le Rat (60 à 70 μg/kg), l'antagonisme par la *d*-tubocurarine est net: les contractions reviennent à leur amplitude initiale en quelques secondes, mais la hauteur des contractions n'est jamais inférieure à l'amplitude normale.

β) cette action antagoniste se révèle même pour des doses sans action curarisante propre chez le Rat (15 à 30 μg/kg: Figure 26).

Cependant, l'action antagoniste ne dépend pas seulement de la dose de *d*-TC, mais aussi du dérivé à antagoniser. Si, pour les thiolos, l'antagonisme est définitif, il ne l'est pas, au contraire, pour les thionos, puisque les contractions reviennent lentement vers la potentialisation maximale, après antagonisme par la *d*-tubocurarine.

b) <u>à titre préventif</u>:

Si on antagonise la potentialisation des contractions —produite par 3 mg/kg de 8061 HC, par exemple,— par 75 μg/kg de *d*-tubocurarine (injectée au temps 0 minute), des injections ultérieures de la même dose de 8061 HC aux temps 20 et 35 minutes n'entrainent qu'une augmentation d'amplitude de 16 à 20 p. 100. Les fasciculations musculaires sont cependant supprimées. La *d*-TC joue donc un rôle antagoniste à titre préventif vis-à-vis du 8061 HC, ce qui se vérifie également avec le Para-oxon.

3) Essai d'interprétation des résultats (III).

La *d*-tubocurarine et les dérivés étudiés sont des antago-

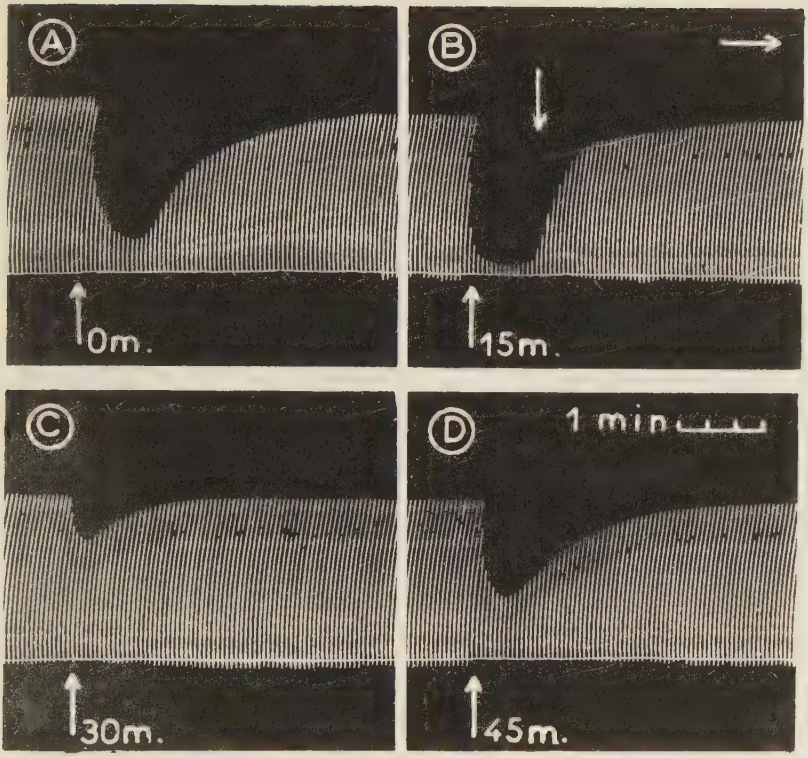


Figure 25: *Antagonisme à titre curatif et préventif de la curarisation par la* d-*tubocurarine qu'exerce le 8063 HC sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En A, B, C et D: à ↑ *d*-tubocurarine 65 µg/kg
En B : à ↓ 8063 HC 5 mg/kg
(Cliché réduit aux 3/4)

nistes réciproques, tant à titre préventif qu'à titre curatif. Cependant, l'antagonisme à titre curatif des antiChE ne se manifeste que pour des doses potentialisatrices des contractions, alors que la *d*-TC, au contraire, même à doses non curarisantes, antagonise la potentialisation produite par les organophosphorés.

L'antagonisme:

– des anticholinestérasiques résulte d'une augmentation de la concentration et de la persistance des effets de l'acétylcholine qui, par compétition, déplace le curare.

– de la *d*-tubocurarine est dû à l'élévation du seuil de sensibilité de la plaque motrice à l'acétylcholine.

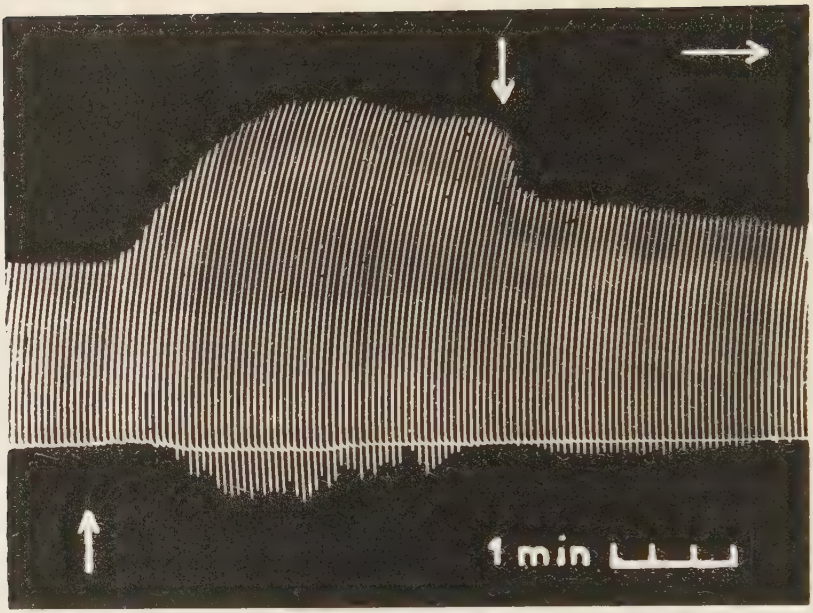


Figure 26: *Antagonisme à titre curatif du 8063 HC par la* d-*tubocurarine sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

à : ↑ 8063 HC 5 mg/kg

à : ↓ *d*-tubocurarine 15 µg/kg

(Cliché non réduit)

IV°– ANTAGONISME OU POTENTIALISATION VIS-À-VIS DE LA SUCCINYLDICHOLINE.

La recherche d'une action antagoniste ou potentialisatrice de la succinyldicholine par les organophosphorés a été entreprise chez le Rat pour tous les thiolophosphates, chez le Lapin et chez le Chat pour le 8061 HC. Comme nous l'avons mentionné précédemment, seul le Chat (et plus particulièrement son muscle tibial) répond à cet acétylcholinomimétique toujours et seulement par le mécanisme dit de dépolarisation. Chez le Lapin et le Rat, la paralysie résulte d'une action mixte: elle débute comme une curarisation par dépolarisation, puis évolue plus ou moins rapidement (selon l'espèce animale et le muscle considéré) vers une curarisation par action compétitive. Nous séparerons donc les résultats obtenus pour chacune des espèces animales.

1) Chez le Rat.

Malgré la multiplication des expériences, peu de conclusions précises peuvent être formulées. En effet, les résultats sont souvent contradictoires, même si on opère dans les mêmes

conditions expérimentales. Ainsi, dans une expérience, le Paraoxon, à une dose de 0,8 mg/kg (deux fois la D.Min.P.Max.) possède une action potentialisatrice nette vis-à-vis de la paralysie à la succinyldicholine; par contre, dans une autre expérience, l'antagonisme d'une même dose est tout aussi évident.

Parmi les dérivés thiolos étudiés, seuls les 8061 HC et 8063 HC ont donné des résultats qui ont été reproduits un nombre suffisant de fois pour permettre quelques conclusions:

a) aux doses faibles et aux D.Min.P.Max., ces dérivés n'ont peu ou n'ont pas d'action. Parfois, un léger antagonisme se manifeste.

b) aux doses fortes (deux fois la D.Min.P.Max.), la paralysie est augmentée. Cette potentialisation de l'action de la succinyldicholine semble faire appel à plusieurs composantes et évolue comme suit: au moment de la reprise des contractions après la paralysie par la succinyldicholine et immédiatement après l'injection du 8061 HC ou du 8063 HC, il y a cassure de la courbe et augmentation de la paralysie. Cette potentialisation de l'action de la succinyldicholine est brève cependant puisque, 20 ou 30 secondes plus tard, une action antagoniste se manifeste. La reprise des contractions est alors brusque, rapide mais transitoire: après récupération partielle, l'amplitude des contractions semble se stabiliser à un niveau inférieur à la normale, mais les contractions reviennent cependant très lentement à leur amplitude initiale.

2) Chez le Lapin.

Chez le Lapin, aucune action potentialisatrice ou antagoniste n'a pu être mise en évidence pour des doses de 2,5, 5 et 10 mg/kg du 8061 HC (la D.Min.P.Max. étant de 5 mg/kg).

3) Chez le Chat.

Nous avons enregistré simultanément les contractions des muscles soléaire et tibial antérieur. Selon la dose administrée, nous avons obtenu les résultats suivants:

a) dose de 2,5 mg/kg: à cette dose, le 8061 HC ne possède aucune action propre sur le tibial antérieur, mais il potentialise l'amplitude des contractions du soléaire. Vis-à-vis de la curarisation par la succinyldicholine, il n'y a aucun effet sur le tibial antérieur mais, sur le soléaire, on note une légère action antagoniste: les contractions atteignent une amplitude supérieure à la normale.

b) dose de 5 mg/kg: sur le tibial antérieur, la profondeur de la paralysie n'est pas modifiée. Seule la durée de la curarisation est légèrement prolongée. L'antagonisme est net sur le soléaire et l'amplitude des contractions devient rapidement supérieure à la normale.

c) dose de 10 mg/kg (Figure 27): sur le tibial antérieur, le

8061 HC potentialise les effets de la succinyldicholine, tant en intensité (profondeur de la curarisation) qu'en durée d'action. Lorsque l'amplitude des contractions est revenue à sa valeur de départ, l'augmentation se poursuit, entrainant ainsi une légère potentialisation des contractions.

Sur le soléaire, ce dérivé antagonise très nettement la curarisation à la succinyldicholine; la phase de paralysie est suivie d'une phase potentialisatrice des contractions.

4) Essai d'interprétation des résultats (IV).

Comment expliquer, chez le Chat, ces différences d'action: potentialisation sur le tibial antérieur et antagonisme sur le soléaire des effets de la succinyldicholine? Seul le mécanisme d'action de la succinyldicholine peut rendre compte de ces phénomènes. Le tibial est un muscle qui, chez le Chat, se comporte de façon absolument pure aux acétylcholinomimétiques. Le soléaire, au contraire, surtout lorsqu'on fait agir des doses répétées, répond de façon mixte aux dépolarisants: au début, les dépolarisants se comportent comme des acétylcholinomimétiques (visible sur la Figure 27 par la contracture au moment de l'injection), mais leur action devient ensuite très rapidement compétitive. Les antiChE, par accumulation d'ACh, intensifient le blocage neuromusculaire sur le tibial. Sur le soléaire, l'ACh s'accumule et déplace, par compétition, la succinyldicholine fixée sur les récepteurs: on obtient donc une action antagoniste.

V°– ACTION DU MÉTHYLSULFATE DE PRALIDOXIME.

Comme réactivateur des ChE bloquées par les antiChE de la série étudiée, nous avons utilisé le méthylsulfate de Pralidoxime à une dose de 20 mg/kg, dissout dans le soluté physiologique de chlorure de sodium.

1) Action propre.

Le Pralidoxime est sans action propre sur la préparation nerf – muscle *in situ*. L'amplitude des contractions n'est pas modifiée, même après administration de très fortes doses de ce réactivateur (60 mg/kg).

2) Action vis-à-vis des dérivés étudiés à basse fréquence de stimulation.

a) action à titre préventif (Figure 28):

Le Pralidoxime, injecté cinq minutes avant une D.Min.P. Max. d'un thiolophosphate, supprime à peu près complètement la potentialisation des contractions. L'augmentation d'amplitude n'apparait qu'après l'injection d'une seconde dose de produit, administrée 20 minutes après la première. Ceci se vérifie également avec le Para-oxon et le TEPP.

Cette action préventive est brève, puisqu'on ne la retrou-

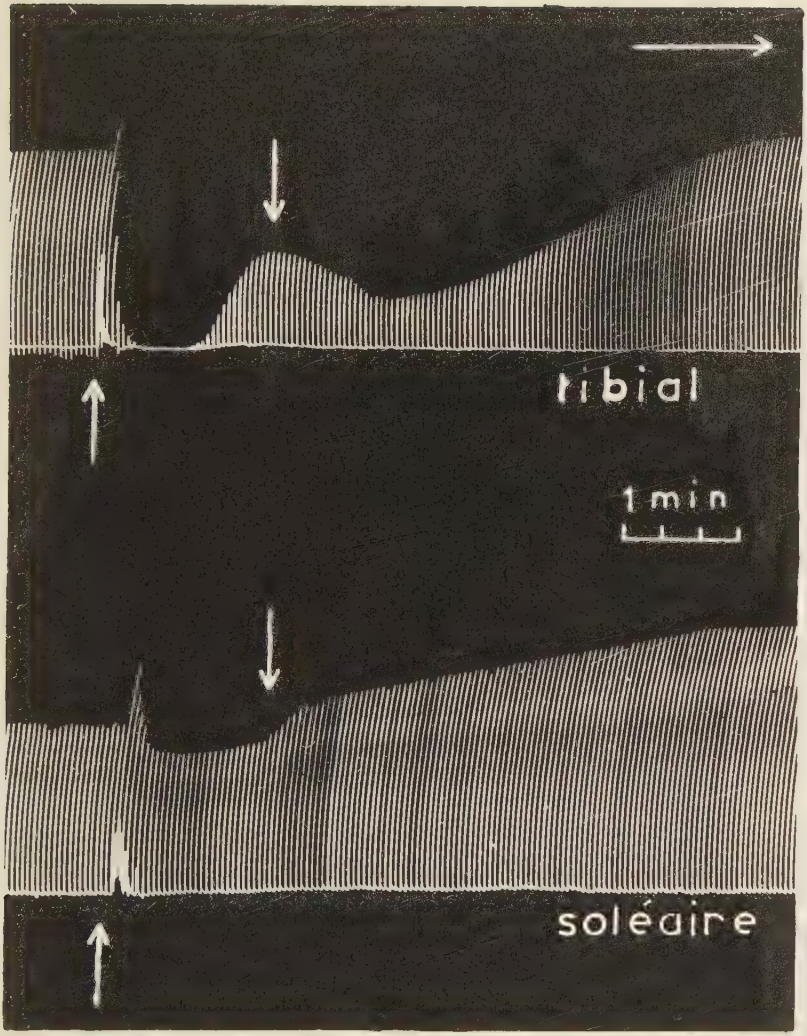


Figure 27: *Antagonisme et potentialisation de la succinyldicholine par le 8061 HC sur la préparation nerf sciatique – muscles tibial antérieur et soléaire de Chat.*

à ↑ : succinyldicholine 70 µg/kg
à ↓ : 8061 HC 10 mg/kg
(deux heures auparavant, l'animal avait reçu une dose identique de succinyldicholine et une dose de 5 mg/kg de 8061)
(Cliché non réduit).

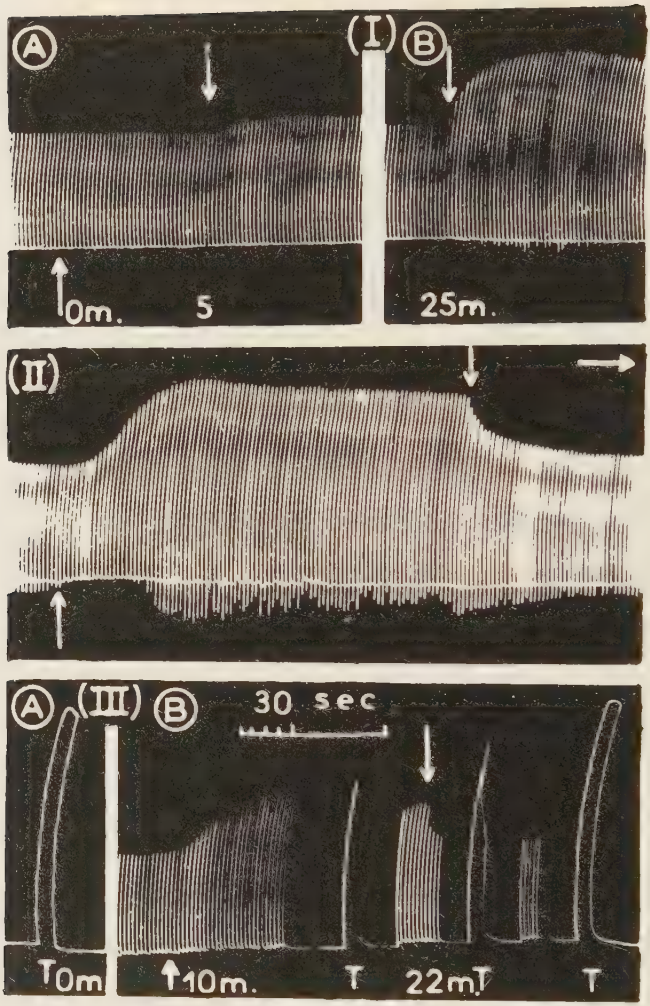


Figure 28: *Antagonisme à titre préventif et à titre curatif du méthylsulfate de Pralidoxime vis-à-vis du 8061 HC sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat, stimulée à basse (6 cycles par minute) et à haute (50 cycles par seconde: T) fréquence.*

En I: à↑ méthylsulfate de Pralidoxime 20 mg/kg
à↓ 8061 HC 3 mg/kg
En II et III:
à↑ 8061 HC 3 mg/kg
à↓ méthylsulfate de Pralidoxime 20 mg/kg

(Cliché réduit aux 5/7)

ve pas avec les thionophosphates injectés dans les mêmes conditions. Si on considère que la période de latence entre le moment de l'injection du thiono et le début de la potentialisation des contractions est de six à sept minutes, il s'écoule un temps supérieur à onze minutes entre l'administration du Pralidoxime et l'action neuromusculaire de l'organophosphoré. L'intensité d'action du réactivateur a suffisamment diminué après ce laps de temps pour ne pas s'opposer à l'action antiChE du dérivé.

b) action à titre curatif (Figure 28).

Le Pralidoxime antagonise la potentialisation des contractions et ramène l'amplitude à sa valeur normale très rapidement. L'action est immédiate (20 à 30 secondes) et la hauteur initiale des contractions est obtenue en quelques minutes. Cette action antagoniste est définitive: il n'y a pas reprise ultérieure de la potentialisation. Elle est valable tant pour les thionos que pour les thiolophosphates (même le 7901 HC), quel que soit le temps pendant lequel les cholinestérases ont été inhibées: le retour à une amplitude normale s'effectue aussi facilement après quelques minutes ou après plusieurs heures de potentialisation des contractions.

Le Pralidoxime, à une dose de 20 mg/kg, antagonise ces dérivés, non seulement pour des D.Min.P.Max., mais aussi pour des doses supramaximales. A 10 mg/kg, la réactivation est presqu'aussi nette.

In vitro, sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat, le Pralidoxime, même à une concentration 20 fois supérieure à celle de l'antiChE (8061 HC, 1 µg/ml) ne possède pratiquement aucune action antagoniste de la potentialisation des contractions (Figure 29).

3) Action vis-à-vis des dérivés étudiés à hautes fréquences de stimulation.

A mesure que l'action antagoniste du Pralidoxime sur la potentialisation des contractions musculaires se manifeste, l'inhibition de WEDENSKY disparait et le muscle peut, de nouveau, répondre à de hautes fréquences de stimulation par un tétanos soutenu. La récupération des propriétés musculaires est très rapide sous l'influence du Pralidoxime. Ainsi, dans la Figure 28, elle est presque complète une minute après administration du réactivateur et est totale après deux minutes. Ceci se vérifie avec tous les dérivés actifs étudiés.

4) Action vis-à-vis de la curarisation (Figure 30).

Alors qu'HOLMES et ROBINS [1955] ont montré sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat que le Pralidoxime était sans action sur le blocage neuromusculaire produit par la *d*-tubocurarine et la succinyldicholine, une série d'expériences, réalisées sur la préparation nerf muscle *in situ* de Rat,

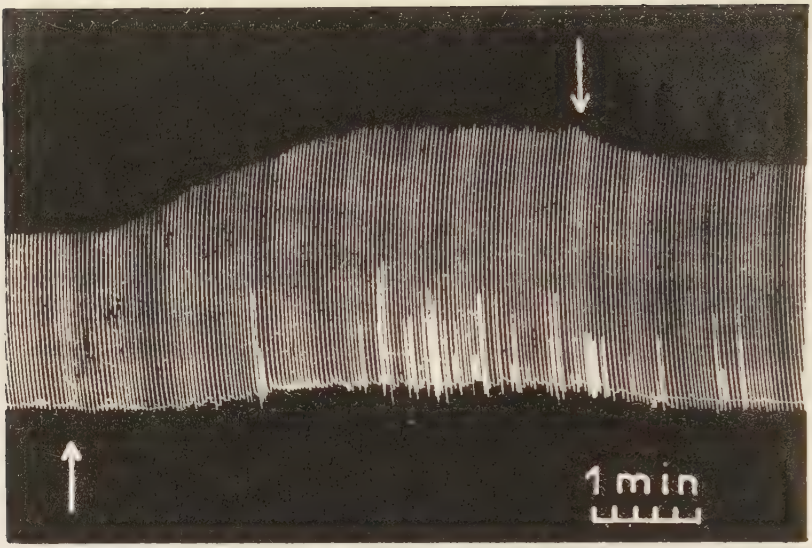


Figure 29: *Action du méthylsulfate de Pralidoxime sur la potentialisation des contractions musculaires obtenue par le 8061 HC sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat.*

à ↑ 8061 HC 0,1 mg (dans un bain
à ↓ Pralidoxime 2,0 mg de 100 ml.)
(Cliché réduit aux 7/8)

---

nous a permis de constater que le Pralidoxime était:

a) un puissant antagoniste de la *d*-tubocurarine: une amplitude presque normale est obtenue après deux ou trois contractions,

b) un faible antagoniste de la succinyldicholine.

5) Essai d'interprétation des résultats (V).

De ces résultats expérimentaux, deux déductions s'imposent:

a) le Pralidoxime s'oppose à toute modification de l'amplitude normale des contractions: il antagonise aussi bien la potentialisation des anticholinestérasiques que la paralysie à la *d*-tubocurarine. Or, deux composés (la *d*-TC et un antiChE) peuvent être des antagonistes réciproques, mais il est curieux de constater qu'un troisième (le Pralidoxime) puisse, à son tour, antagoniser les deux premiers. Outre son pouvoir réactivateur, le Pralidoxime possède-t-il un autre mécanisme d'action?

b) l'action antagoniste du Pralidoxime se manifeste, d'une part, pour un curarimimétique (la *d*-tubocurarine) et, d'autre part, pour un acétylcholinomimétique (la succinyldicholine), ce qui

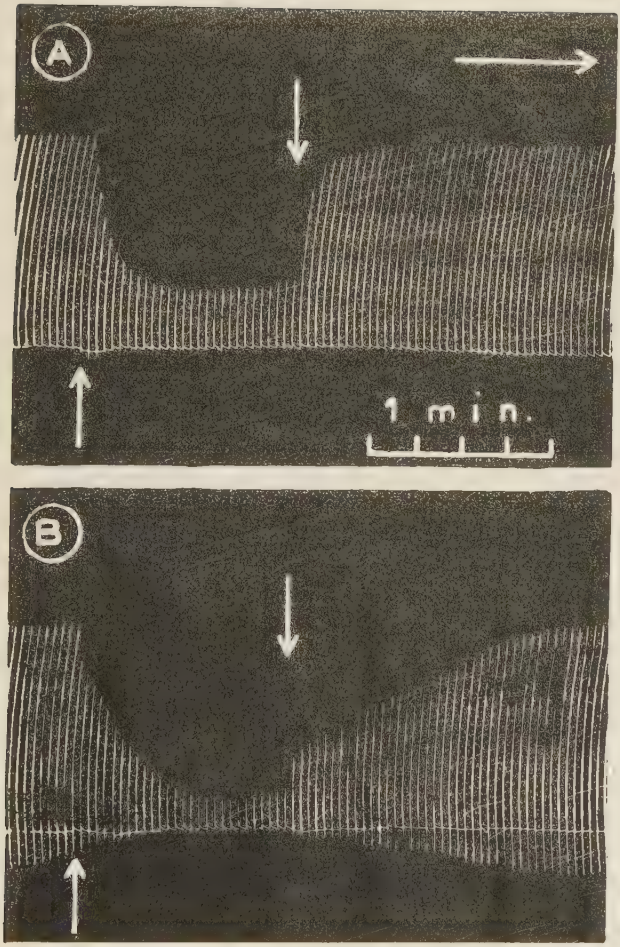


Figure 30: *Action antagoniste de la curarisation par la d-tubocurarine ou par la succinyldicholine qu'exerce le méthylsulfate de Pralidoxime sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat.*

En A:	à ↑	*d*-tubocurarine	75 µg/kg
	à ↓	méthylsulfate de Pralidoxime	20 mg/kg
En B:	à ↑	succinyldicholine	125 µg/kg
	à ↓	méthylsulfate de Pralidoxime	20 mg/kg

(Cliché non réduit)

constitue un autre fait curieux. Cependant, l'action antagoniste du Pralidoxime vis-à-vis de la succinyldicholine s'explique probablement par le fait que ce dépolarisant agit comme un curarisant de type mixte chez le Rat. La préparation neuromusculaire *in situ* de cet animal n'est pas parfaite pour l'étude d'une action antagoniste ou potentialisatrice de la succinyldicholine; il serait donc intéressant de vérifier ces résultats sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Chat.

VI°– TENTATIVE DE RECHERCHE DU LIEU ET DU MÉCANISME D'ACTION.

Nous avons vu jusqu'à maintenant que l'action des thiols et des thionos était qualitativement identique sur la préparation nerf – muscle *in situ*: ces dérivés déterminent une potentialisation des contractions. Cependant, les caractéristiques de cette potentialisation (latence et durée) varient en fonction de l'isomère considéré. Nous nous sommes intéressé à rechercher d'autres différences d'action entre les thiolophosphates et les thionophosphates et à déterminer le lieu et le mécanisme d'action de ces composés. Les techniques faisant appel

– à l'injection intra-artérielle proche du muscle,

– à l'enregistrement des contractions de la préparation nerf phrénique – muscle diaphragme isolés de Rat,

– à l'enregistrement, chez le Lapin et chez le Rat, des contractions du muscle tibial antérieur de chaque patte, l'un innervé et stimulé indirectement, l'autre énervé et stimulé directement, nous ont permis d'obtenir quelques résultats.

En raison du nombre des produits, seuls les deux isomères les plus actifs, les 8056 HC et 8061 HC, ont été étudiés (sauf dans le cas de la recherche d'une action directe sur le muscle tibial antérieur énervé de Rat, où tous les dérivés actifs ont été essayés).

1) Action des dérivés sur la préparation nerf sciatique – muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin, après injection intra-artérielle proche.

Des expériences préliminaires nous ont permis de nous assurer qu'après injection intraveineuse de l'organophosphoré, la sensibilité des muscles gastrocnémien-soléaire était à peu près comparable à celle du tibial antérieur (Figure 31): celui-ci est sensible à une dose de 5 mg/kg de 8056 HC et de 8061 HC, et les muscles gastrocnémien-soléaire sont sensibles à la même dose de 8061 HC.

a) <u>action du 8061 HC</u> (Figures 31 et 33):

Après injection intra-artérielle proche d'une dose de 30

µg, ce thiolophosphate détermine une action qualitativement et quantitativement identique à celle que l'on obtient après administration par voie intraveineuse de 5 mg/kg du même produit: la potentialisation est instantanée, atteint un plateau en quelques contractions, mais la phase de décroissance ramène les contractions à leur amplitude normale en 10 à 20 minutes. Des doses plus fortes (jusqu'à 150 µg) n'ont fait qu'augmenter légèrement la durée de cette potentialisation, mais aucune action triphasique n'a pu être démontrée.

Un calcul simple permet de constater qu'il n'y a aucune proportionnalité entre les doses actives intraveineuses et intra-artérielles. Considérons, par exemple, un lapin de 2,5 kg, dont le poids des muscles gastrocnémien-soléaire est de 20 g (le poids de ces muscles varie, pour un lapin d'environ 2,5 kg, entre 15 et 20 g). La dose active intra-artérielle est de 30 µg, ce qui équivaut à 1,5 µg/g ou à 1,5 mg/kg. Or, la dose active par voie intraveineuse est de 5 mg/kg, c'est-à-dire quatre fois plus grande environ. Il faut donc admettre que, d'une part, la fixation par le foie ou d'autres tissus est certainement importante et que, d'autre part, les réactions de détoxication sont rapides.

b) action du 8056 HC (Figure 31):

Contrairement au 8061 HC, le 8056 HC (thionophosphate) ne modifie aucunement l'amplitude des contractions, même après injection intra-artérielle proche de 200 µg. La solubilité du produit dans le soluté physiologique ne nous a pas permis d'injecter des doses plus fortes. Cependant, si on considère que:

– la sensibilité du tibial antérieur de Lapin pour le 8056 HC et le 8061 HC est la même par voie intraveineuse (5 mg/kg),

– rapportée au poids de l'animal, la dose de 200 µg injectée dans l'artère équivaut à une dose de 10 mg/kg (soit deux fois la D.Min.P.Max.) par voie intraveineuse,

– la fixation par le foie ou autres tissus, de même que les réactions de détoxication nécessitent une multiplication de cette dose (10 mg/kg) par un certain facteur supérieur à 1,

on doit conclure que le 8056 HC est inactif à la jonction neuro-musculaire après injection intra-artérielle proche.

2) Action des thiophosphates sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat.

Les résultats obtenus sur cette préparation confirment les précédents;

a) action du 8061 HC (Figures 23 et 29):

A une concentration de 1 µg/ml et après une période de latence de trois à cinq minutes, ce thiolophosphate potentialise les contractions; des fasciculations apparaissent et s'enregis-

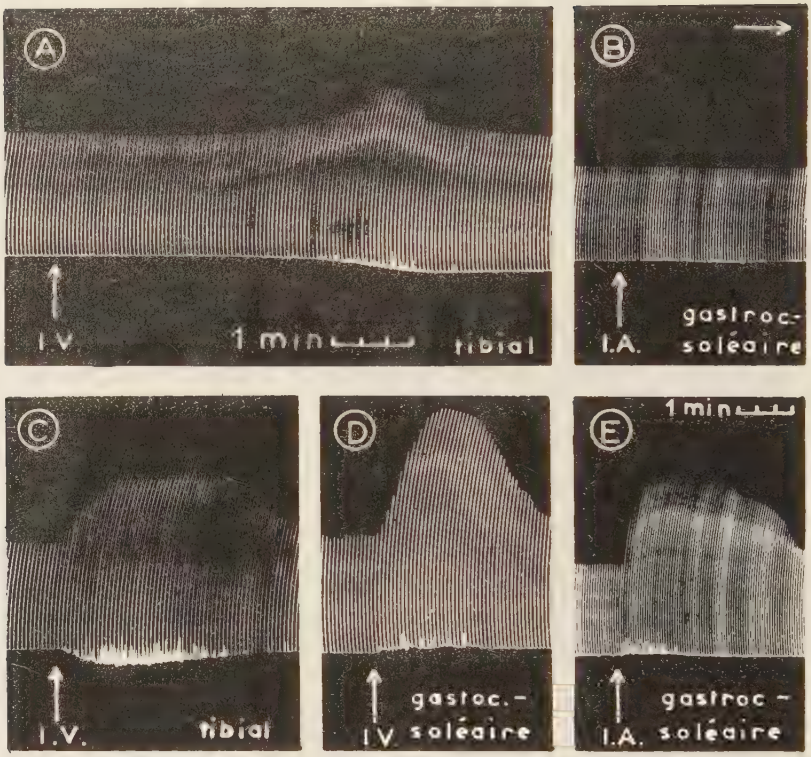


Figure 31: *Action d'un thionophosphate (8056 HC) et d'un thiolophosphate (8061 HC) sur la préparation nerf sciatique — muscle tibial antérieur ou muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin, après injection intraveineuse (I.V.) ou intra-artérielle (I.A.)*

En A:	8056 HC (I.V.)	5 mg/kg
En B:	8056 HC (I.A.)	200 µg
En C:	8061 HC (I.V.)	5 mg/kg
En D:	8061 HC (I.V.)	5 mg/kg
En E:	8061 HC (I.A.)	20 µg

(Cliché réduit aux 3/4)

trent entre deux stimulations. La durée de la potentialisation dépend du temps de contact entre le composé et la préparation, puisque les contractions ne reviennent à leur amplitude initiale qu'après lavage de la préparation. Pour des concentrations supérieures, on obtient les mêmes résultats, mais la période de latence est diminuée.

Le 8061 HC diffère du Para-oxon par la durée de la potentialisation. Pour celui-ci, elle est transitoire, même si le Pa-

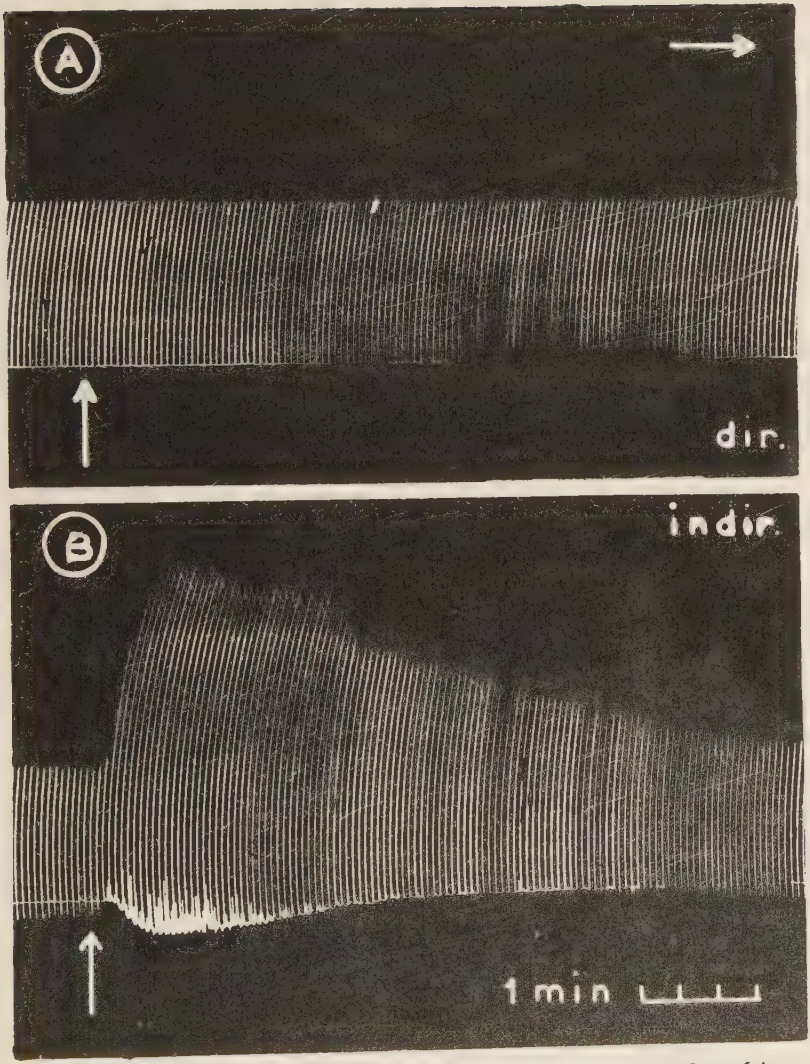


Figure 32: *Action du 8061 HC (5 mg/kg) sur le muscle tibial antérieur de Lapin.*

En A: muscle énervé et stimulé directement..
En B: muscle innervé et stimulé indirectement.
(Cliché non réduit)

---

ra-oxon est maintenu dans le bain au contact de la préparation (voir page 75).

b) <u>action du 8056 HC</u>

Ce thionophosphate, même à une concentration de 100 μg/ml, est inactif.

3) Recherche d'une action directe sur le muscle tibial énervé.

Si on stimule alternativement toutes les dix secondes le même muscle par une excitation directe et par une excitation indirecte, on obtient, après administration d'un anticholinestérasique, une potentialisation de ces deux types de contractions. L'augmentation d'amplitude observée sur le muscle stimulé directement résulte en réalité d'une diffusion de l'excitation vers la plaque motrice. Voilà pourquoi, on enregistre simultanément les contractions du tibial antérieur de chaque patte, l'un énervé depuis 15 (Rat) ou 21 (Lapin) jours et stimulé directement, l'autre stimulé par l'intermédiaire du nerf.

a) chez le Rat:

Tous les dérivés actifs ont été étudiés, de même que les substances de référence:

– sur le muscle innervé, stimulé indirectement, on obtient, pour les D.Min.P.Max., la même action potentialisatrice précédemment décrite.

– sur le muscle énervé, stimulé directement, on observe aucune potentialisation des contractions. Cependant, à mesure que l'action potentialisatrice des contractions se développe sur le muscle innervé, le tonus de base du muscle énervé augmente légèrement (de un à deux millimètres), mais cette augmentation est de courte durée et disparait en quelques minutes.

b) chez le Lapin (Figure 32):

Seuls, les 8061 HC et Para-oxon ont été étudiés. Sur le muscle énervé, ces deux composés ne potentialisent pas les contractions ni ne modifient le tonus musculaire.

4) Potentialisation de la contraction à l'acétylcholine exogène après injection intra-artérielle proche par le 8061 HC.

Sur les muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin, le 8061 HC potentialise la contraction obtenue par injection intra-artérielle proche d'acétylcholine (Figure 33). Plusieurs expériences ont permis de déterminer que:

– la potentialisation de l'ACh exogène n'apparait qu'avec des doses actives de 8061 HC (20 à 30 μg).

– le degré de potentialisation de l'ACh exogène est directement proportionnel à la dose de 8061 HC injectée.

– la potentialisation de l'action de l'ACh exogène ne dure que pendant la période de potentialisation des contractions musculaires obtenues par stimulation indirecte.

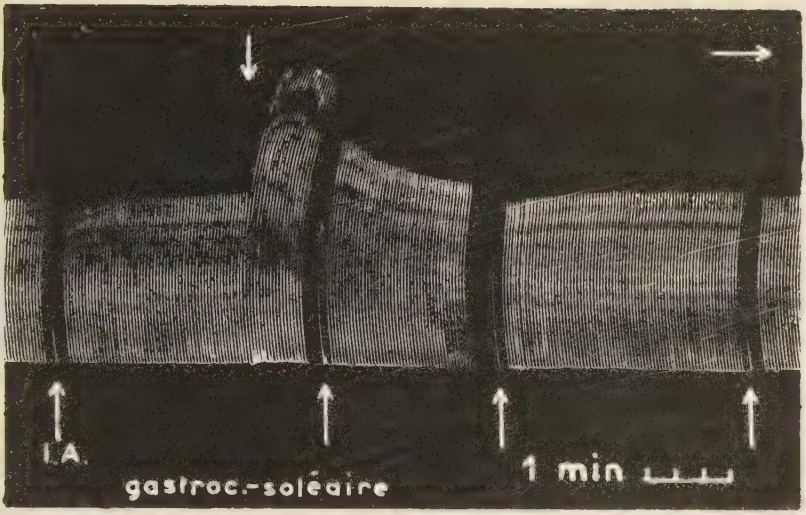


Figure 33: *Potentialisation de la contraction à l'acétylcholine exogène par le 8061 HC sur la préparation nerf sciatique – muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin. (Les injections se font par voie intra-artérielle proche).*

à ↑ : acétylcholine 20 µg.
à ↓ : 8061 HC 20 µg.
(Cliché réduit aux 3/4)

---

5) Essai d'interprétation des résultats (VI).

Les isomères 8056 HC et 8061 HC ont, *in vivo*, une action qualitativement identique. La période de latence du thiolophosphate correspond au temps circulatoire: le 8061 HC et les thiolos en général manifestent donc comme tels leur action inhibitrice sur les cholinestérases. Pour le 8056 HC, la période de latence qui s'écoule entre le moment d'injection et la potentialisation des contractions laisse supposer que ce thionophosphate (tout comme le 8057 HC) doit subir une certaine activation métabolique *in vivo* avant de manifester son pouvoir anticholinestérasique et son action au niveau de la jonction neuromusculaire. Ceci est confirmé par trois séries de faits:

a) le 8056 HC est inactif comme inhibiteur des ChE (pseudo et vraies) *in vitro*, contrairement au 8061 HC. Les thionophosphates n'ont aucun pouvoir inhibiteur *in vitro*, alors que les thiolophosphates manifestent une action inhibitrice.

b) le 8056 HC est inactif sur la préparation nerf – muscle (nerf phrénique – diaphragme) isolés de Rat, alors que le 8061 HC est actif.

c) le 8056 HC est inactif sur la préparation nerf sciatique – muscles gastrocnémien-soléaire de Lapin après injection intra-artérielle proche, alors qu'il est actif s'il est injecté dans la circulation générale (par voie intraveineuse).

La comparaison entre le temps de latence et la durée d'action (Tableau XIX) des thionos et des thiolos permet de conclure que si le thiono nécessite cette période de latence pour être activé *in vivo,* par contre, le métabolite forme un complexe beaucoup plus stable avec l'enzyme, ce qui se traduit par une longue durée d'action (potentialisation musculaire prolongée).

Au sujet de la localisation de l'action de ces produits, on peut conclure que:

α) les dérivés étudiés ont une action nulle ou presque nulle sur le muscle énervé. La potentialisation des contractions du muscle innervé résulte donc d'une action au niveau de la plaque (persistance des effets de l'ACh par suite de l'inhibition des ChE, d'où contraction de type tétanique) ou au niveau des terminaisons nerveuses pré-synaptiques (augmentation de la libération des quantums d'ACh sous l'influence d'un influx nerveux). Le blocage neuromusculaire obtenu aux hautes fréquences de stimulation ne fait que confirmer ces conclusions.

β) la potentialisation de la contraction par l'ACh exogène qu'exerce le 8061 HC élimine la possibilité d'une action au niveau des terminaisons nerveuses (c'est-à-dire une augmentation de la libération des quantums d'ACh) et montre que l'action potentialisatrice des contractions est due à une action au niveau de la plaque. L'augmentation d'amplitude des contractions obtenues par injection d'ACh ou par stimulation du nerf résulte donc d'une persistance des effets de l'acétylcholine au niveau des récepteurs, c'est-à-dire d'une hydrolyse enzymatique fortement diminuée: c'est l'action anticholinestérasique, confirmée d'ailleurs par l'action anticurare de ces dérivés et par la potentialisation de la paralysie à la succinyldicholine chez le Chat.

QUATRIÈME PARTIE

SYSTÈME NERVEUX AUTONOME

Le système nerveux autonome, responsable de la régulation des mécanismes involontaires de l'organisme, règle et coordonne les fonctions des viscères. Il exerce sur eux une action continue, dans des circonstances physiologiques déterminées, au cours desquelles il excite ou inhibe leur activité. Les fibres nerveuses qui interviennent dans cette régulation sont soit adrénergiques, soit cholinergiques. Le médiateur chimique au niveau post-ganglionnaire est, pour les premières, la nor-adrénaline et, pour les secondes, l'acétylcholine (ACh). Par contre, au niveau préganglionnaire, l'ACh est, pour toutes les fibres, le médiateur commun.

Les organophosphorés, par inhibition des cholinestérases (ChE), s'opposent à la destruction rapide de l'ACh et prolongent indirectement son action; ils interfèrent donc dans le bon fonctionnement du système nerveux autonome (S.N.A.), et agissent indirectement sur les organes et tissus innervés par des nerfs effecteurs autonomes.

Nous étudierons l'action de quelques dérivés sur

- les glandes salivaires,
- l'appareil cardiovasculaire,
- les muscles lisses.

CHAPITRE I

ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES SUR LES GLANDES SALIVAIRES

I°– GÉNÉRALITÉS.

1) Action générale des anticholinestérasiques sur les sécrétions glandulaires.
2) Cholinestérases des glandes salivaires.
3) Action des anticholinestérasiques sur la glande sous-maxillaire.
   a) potentialisation de la sécrétion.
   b) sécrétion spontanée.

II°– MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.

1) Technique utilisée: fistule salivaire chez le Chien.
2) Protocole expérimental.

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I°– GÉNÉRALITÉS.

1) Action générale des anticholinestérasiques sur les sécrétions glandulaires.

Les cellules sécrétrices des glandes lacrymales, sudorales, bronchiques, salivaires (1), gastriques et pancréatiques ont une innervation cholinergique; par ce fait, le débit glandulaire, influencé par les organophosphorés (Il'Yuchenok [1955]), est proportionnel à la sévérité des signes toxicologiques. En général, lorsque la dose de l'antiChE ne provoque, chez l'animal, aucune fasciculation, le volume des sécrétions n'est pas modifié. Mais, à l'apparition des fasciculations musculaires correspond une augmentation des sécrétions glandulaires. L'importance de ces hyper-sécrétions apparait lors d'une intoxication: ainsi, l'accumulation des sécrétions salivaires et bronchiques dans les voies aériennes supérieures accentue la gêne respiratoire produite par l'action du composé au niveau de la jonction neuromusculaire (nerf phrénique – muscle diaphragme) et du centre respiratoire lui-même.

Les antiChE ont un effet plus marqué sur le débit salivaire que sur les sécrétions bronchiques (Cullumbine et Dirnhuber [1955]). En extrapolant à l'Homme des résultats obtenus chez le Lapin et le Singe, Cullumbine a calculé que, lors d'une intoxication grave, si aucune mesure thérapeutique n'était appliquée, le volume des sécrétions salivaires pourrait atteindre 1,75 litres.

2) Cholinestérases des glandes salivaires.

Beznak [1932] a montré que l'ACh était le médiateur chimique entre l'influx nerveux parasympathique et les récepteurs responsables de la sécrétion salivaire. Cinq ans plus tard, MacIntosh [1937] mit en évidence une activité cholinestérasique considérable dans la glande sous-maxillaire; chez le Chat comme chez le Chien, cette glande contient une concentration en acétylcholinestérases (AChE) supérieure à celle en butyrylcholinestérases (BuChE). Les AChE semblent donc jouer la fonction physiologique la plus importante: de fortes doses d'inhibiteurs spécifiques de BuChE –entrainant une inhibition de 80 p. 100– ne font apparaitre ni salivation spontanée, ni potentialisation importante de l'action sécrétrice de l'ACh exogène.

L'hypersécrétion des glandes salivaires, après traitement par les organophosphorés, résulte de l'inhibition des ChE. De nombreux auteurs l'ont confirmé par des dosages d'activité enzymatique de glandes traitées et de glandes témoins. L'accumu-

(1) Les glandes salivaires ont également une innervation sympathique.

lation d'ACh dans le sang circulant, consécutif à l'administration d'un antiChE, se saurait être mise en cause, étant donné que:

– le début de la sécrétion salivaire, après injection intra-artérielle d'un antiChE, est trop rapide (DIRHUBER et LOVATT EVANS [1954]) ,

– de très fortes doses de produit sont nécessaires pour produire une augmentation de la concentration d'ACh dans le sang.

De plus, l'hypersécrétion ne saurait résulter d'une action de l'antiChE sur les centres salivaires situés dans le bulbe rachidien: HEINDENHAIN [1872] a en effet montré, avec l'ésérine, que le taux de sécrétion n'est pas influencé par la section de tous les nerfs innervant la glande sous-maxillaire.

3) Action des anticholinestérasiques sur la glande sous-maxillaire.

a) potentialisation de la sécrétion:

L'observation de HEINDENHAIN [1872], selon laquelle l'ésérine potentialise les effets provoqués par l'injection d'ACh ou par stimulation de la corde du tympan, a été confirmée par plusieurs auteurs, en particulier par DIRHUBER et LOVATT EVANS [1954] sur la glande sous-maxillaire de Chien et de Chat. Ces phénomènes s'observent pour une inhibition d'environ 30 p. 100 des AChE.

b) sécrétion spontanée:

L'administration des petites doses répétées ou d'une forte dose d'antiChE déclenche une sécrétion spontanée. Les expériences de RIKER et WESCOE [1949], réalisées chez des chats traités au DFP, permettent de conclure que la sécrétion spontanée n'apparait que lorsque l'inhibition des ChE totales atteint 90 p. 100, ce qui correspond, pour les AChE, à une inhibition d'environ 60 p. 100.

II°– MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.

1) Technique utilisée: fistule salivaire (glande sous-maxillaire) chez le Chien.

L'animal est anesthésié par injection, dans la veine saphène externe, de 12 ml/kg d'une solution tiède de chloralose à 1 p. 100. L'animal est alors placé sur le dos, la mâchoire tendue horizontalement en avant. Ainsi, après avoir rasé la partie où l'incision doit être faite, on incise la peau et le peaucier sur une longueur d'environ cinq à six centimètres, à partir de l'angle du maxillaire inférieur –et parallèlement à son bord interne– jusqu'à la commissure labiale. On récline en dehors le muscle digastrique et on sectionne avec précaution le très mince muscle mylo-hyoïdien. On aperçoit, sous le nerf lingual et perpendiculairement à ce dernier, le canal de WHARTON que l'on incise en V

afin d'y introduire, vers la glande sous-maxillaire, une canule en polythène. Un peu plus profondément, on dégage également la corde du tympan (branche du facial).

L'animal est soumis à la respiration artificielle dès le début de l'expérience, puisqu'à fortes doses, les antiChE provoquent une dépression respiratoire.

2) Protocole expérimental.

Le 8061 HC, thiolophosphate le plus actif, a été étudié sur deux chiens mâles de 18 kg, l'injection du produit étant pratiquée dans la veine saphène externe.

Le protocole que nous avons utilisé est le suivant: on recueille pendant 30 minutes la salive sécrétée spontanément et on note le volume. On excite alors la corde du tympan par des influx de courant rectangulaire, dont les paramètres sont les suivants:

- voltage : 5 volts,
- largeur du stimulus : 0,1 milliseconde,
- fréquence des stimulus : 10 cycles par seconde.
- durée de la stimulation : 25 secondes.

On recueille les sécrétions pendant cinq minutes et on note également le volume.

Puix, on injecte, toutes les 45 minutes, des doses croissantes de produit. Après administration, on vérifie si:

- le volume des sécrétions spontanées augmente (pendant les 30 premières minutes),
- la stimulation de la corde du tympan augmente les sécrétions.

Comme le 8061 HC a été dissout dans 0,2 ml d'éthanol à 95°, des essais préliminaires ont été réalisés dans le but de nous assurer que ce solvant était sans action propre.

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Les résultats que nous avons obtenus figurent dans le Tableau XX. Ceux-ci confirment ce qui a été observé jusqu'ici: l'augmentation des sécrétions après stimulation de la corde du tympan se manifeste pour une dose de 8061 HC inférieure à celle qui s'avère nécessaire pour déclencher un écoulement spontané. L'action du 8061 HC, à une dose de 12 mg/kg, semble être maximale, puisqu'une dose ultérieure de 18 mg/kg ne modifie presque pas la valeur des sécrétions spontanées ou provoquées.

Dechezlepretre [1965] a vérifié sur les sécrétions salivaires obtenues après administration d'une dose de 3 mg/kg de ce même produit –et par stimulation de la corde du tympan– que

	Sécrétion spontanée ml	Sécrétion après stimulation de la corde du tympan ml
Volume témoin	0	1
8061 HC, 3 mg/kg	0	1
8061 HC, 6 mg/kg	0	1,4
8061 HC, 12 mg/kg	7,8	2,1
8061 HC, 18 mg/kg	8,0	2,1

Tableau XX: *Action du 8061 HC sur les sécrétions de la glande sous-maxillaire chez le Chien.*

l'activité amylasique (1) était nulle.

Autres résultats expérimentaux:

Lors de l'étude du 8061 HC sur la préparation neuro-musculaire, nous avons mesuré, chez deux lapins et six rats, le volume des sécrétions salivaires, après des doses croissantes de 8061 HC. Le Tableau XXI nous indique les valeurs obtenues, de même que les résultats de dosages d'activité amylasique chez chaque animal (Ces dosages d'activité amylasique ont été réalisés par DECHEZLEPRETRE [1965].

L'hypersécrétion salivaire n'apparait, chez le Lapin et chez le Rat, qu'avec des doses pour lesquelles on obtient des

Espèce animale	8061 HC mg/kg	Sécrétions salivaires en ml (volume témoin = 0)	Activité amylasique (unités)
Lapin	5	8,6	495, 1180
	10	9,6	- - -
	20	9,2	- - -
Rat	5	0,2 à 0,3	205, 248, 96
	10	0,5	420, 420, 486

Tableau XXI: *Action du 8061 HC sur les sécrétions salivaires chez le Lapin et chez le Rat. Dosage de l'activité amylasique.*

(1) L'activité amylasique est représentée par la quantité de glucides libérés –exprimée en mg de glucose– par l'hydrolyse enzymatique d'un empois d'amidon à 37°C et en trois minutes.

fasciculations musculaires ou une potentialisation des contractions musculaires. Des doses inactives sur les muscles striés pour augmenter l'amplitude de la contraction sont inefficaces pour déclencher cette hypersécrétion. Pour les thiolos, elle est immédiate; pour les thionophosphates, elle ne débute que six ou sept minutes après l'injection, c'est-à-dire au moment de la phase potentialisatrice des contractions ou de l'apparition des fasciculations.

Les quantités sécrétées chez le Lapin font penser –comme chez le Chien– qu'après une certaine dose, ici de 5 mg/kg, l'activité sécrétrice maximale est atteinte et que des doses plus fortes ne peuvent l'augmenter.

Signalons ici que, chez le Lapin et chez le Rat, les doses provoquant des sécrétions spontanées sont beaucoup plus faibles que celles qui doivent être utilisées chez le Chien. Cet animal est donc beaucoup moins sensible au 8061 HC que les deux autres espèces.

CHAPITRE II

ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES SUR LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

I°– GÉNÉRALITÉS.

1) Pression artérielle et circulation périphérique.
2) Coeur.
   a) oreillettes.
   b) ventricules.

II°– MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.

1) Chez le Chien
   a) techniques utilisées.
   b) choix des produits et des doses; mise en solution.
2) Chez le Lapin et le Rat.

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1) Action propre.
   a) pression artérielle.
      - chez le Chien, - chez le Lapin, - chez le Rat.
   b) coeur *in situ*
2) Potentialisation des effets de l'acétylcholine.
   a) sur la pression artérielle.
   b) sur l'oreillette.
3) Essais de réactivation par le méthylsulfate de Pralidoxime.
   a) chez le Rat.
   b) chez le Lapin.
   c) chez le Chien.

I°– GÉNÉRALITÉS.

1) Pression artérielle et circulation périphérique.

Chez la plupart des espèces animales, les antiChE, injectés par voie intraveineuse, produisent une chute marquée de la pression artérielle. Cette hypotension résulte:

– soit d'une bradycardie –d'où diminution du débit cardiaque–,

– soit d'une diminution de la résistance périphérique –vasodilatation– par action locale du composé,

– soit des deux phénomènes additionnés.

Cependant, chez certaines espèces et avec certains produits, il est possible d'observer, au contraire, une augmentation de la pression artérielle. Une hypertension est ainsi obtenue:

– chez le Rat avec l'ésérine (VARAGIC [1955]) ou avec certains organophosphorés, tels le Para-oxon, le Sarin et le TEPP (DIRNHUBER et CULLUMBINE [1955]),

– chez le Chien avec de faibles doses de TEPP (PAULET [1954]) ou de Sarin (DEBURGH et WRIGHT [1956]),

– chez le Lapin avec le Tabun (HOLMSTEDT [1951]).

Selon DEBURGH et WRIGHT [1956], PAULET [1954], la vasoconstriction périphérique, cause de l'hypertension, proviendrait, en partie, de l'augmentation du tonus sympathique, par suite d'une action centrale –au niveau du centre vasomoteur– de l'antiChE. Cependant, d'autres mécanismes doivent aussi être considérés:

a) l'action excitante sur les ganglions sympathiques,

b) la libération d'une substance sympathomimétique (probablement l'adrénaline) par les glandes surrénales,

c) l'augmentation des réflexes sensoriels,

d) l'asphyxie des centres supérieurs.

De plus, chez le Rat, les antiChE traversent la barrière hémato-encéphalique et agissent sur les centres médullaires, produisant ainsi une accélération du rythme cardiaque.

2) Coeur.

La bradycardie est un des premiers effets discernables à la suite de l'administration d'un antiChE (HEYMANS et coll. [1956]). Elle ne résulte ni d'une action réflexe –stimulation des chémorécepteurs du sinus carotidien– ni d'une action directe sur le centre vagal cardio-inhibiteur, puisqu'elle n'est pas influencée par l'énervation du sinus carotidien (HEYMANS [1951]) ou par la vagotomie (HEYMANS [1950]). Elle est supprimée partiellement par les ganglioplégiques (à des doses diminuant la réponse des synapses vagales intracardiaques) et complètement par des doses suffisamment fortes d'atropine (HOLMSTEDT [1951], HEYMANS et coll. [1956]) ou de méthylsulfate de Pralidoxime (ERDMANN et LENDLE [1958]).

a) oreillettes:

∝) action des antiChE sur les butyrylcholinestérases.

La butyrylcholinestérase (BuChE) est l'enzyme prédominante de la paroi auriculaire chez le Chien et le Chat (HOLMES [1957]). BURN et WALKER [1954], sur une préparation coeur – poumon, ont montré que le Nu 683 (1), inhibiteur spécifique des BuChE, produit une action chronotrope négative; par contre, le 284.C.51 (2), inhibiteur spécifique des AChE, est sans action. Ces auteurs concluent d'une part que l'effet chronotrope négatif résulte de l'inhibition des BuChE et, d'autre part, que l'ACh, produite localement, contrôle le noeud sino-auriculaire ("pacemaker") –ce qui est conforme à l'hypothèse de BULBRING et BURN [1949] selon laquelle le contrôle de l'activité du muscle cardiaque est assuré par la formation locale d'ACh.

β) action des antiChE sur des sites non estérasiques.

Les effets des antiChE sur l'oreillette ne résultent pas uniquement d'une inhibition enzymatique; en effet, un arrêt complet des contractions provient en grande partie d'un défaut de conduction (BRISCOE et BURN [1954]). Ainsi, la quinidine, douée de propriétés dromotropes négatives, agit en synergie avec l'ésérine. BURN et KOTTEGODA [1953] ont également montré que lorsque les contractions auriculaires sont arrêtées par de fortes doses d'ésérine, l'oreillette n'est pas excitable électriquement. Ces résultats devront cependant être confirmés par de nombreuses expériences, car il est actuellement certain que les propriétés conductrices de l'oreillette diffèrent en fonction de l'espèce animale utilisée.

b) ventricules:

Le rythme idio-ventriculaire est diminué par l'ACh. Cette diminution est accentuée par l'ésérine, mais elle est partiellement ou complètement antagonisée par l'atropine.

II°– MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.

1) Chez le Chien

a) Techniques utilisées:

Les animaux sont toujours anesthésiés au chloralose (0,12 g/kg). Lorsqu'en cours d'expérience –qui peut durer toute une journée– la profondeur de l'anesthésie est insuffisante, on administre une demi-dose (0,06 g/kg) de l'anesthésique. Les

(1) Nu 683: bromure de (phényl–5 N–diméthyl carbamoyloxy–2) benzyl triméthylammonium.

(2) 284.C.51: dibromométhylate de di (p. N–allyl N–méthyl aminophényl) –1,5–pentanone–3.

animaux sont soumis à la respiration artificielle dès le début de l'expérience.

En général, nous avons enregistré simultanément:

– la pression artérielle –intracarotidienne–: une canule de verre, remplie de liquide manométrique et reliée par un tube de caoutchouc à un manomètre de LUDWIG, est introduite dans l'artère, vers le coeur.

– les contractions auriculaires et ventriculaires du coeur *in situ* reposant sur le lit péricardique (GAUTRELET [1932]).

– les mouvements de l'intestin *in situ* (GAUTRELET [1932]).

b) Choix des produits et des doses; mise en solution.

L'activité des différents thiophosphates sur la préparation neuromusculaire de Rat nous a servi de critère pour le choix des produits à essayer et des doses à administrer. En raison des résultats obtenus avec ces dix dérivés, l'activité de six d'entre eux sur le système cardiovasculaire a été étudiée:

– les 7900 HC et 7901 HC, peu ou pas actifs sur la préparation nerf – muscle de Rat; ils constituent, par rapport aux autres thiophosphates, une catégorie spéciale, tant par leurs actions pharmacologiques que par leur structure chimique.

– les 8056 HC et 8061 HC, isomères les plus actifs des mono-thiophosphates.

– les 8059 HC et 8063 HC, isomères dithiophosphates, le 8063 HC étant le plus actif de sa catégorie.

La substance de référence, le Para-oxon (Mintacol*), a également été étudiée.

L'injection intraveineuse d'une fraction (1/10) de la DL 50 –intrapéritonéale– chez la Souris n'a pas été définitivement retenue; après quelques essais préliminaires, nous avons choisi d'injecter, par voie intraveineuse, la moitié de la dose minimale potentialisatrice maximale (D.Min.P.Max.) sur la préparation neuromusculaire de Rat. Pour les produits inactifs au niveau de la jonction myoneurale, des doses croissantes ont été administrées à intervalles réguliers.

En raison de la solubilité des produits,

– les 7900 HC et 8059 HC ont été injectés tels quels, sans l'aide de solvant,

– les 7901 HC et Para-oxon ont été solubilisés dans 0,2 ml de soluté physiologique de chlorure de sodium,

– les 8056 HC, 8061 HC et 8063 HC ont été mis en solution dans 0,2 ml d'éthanol à 95°.

Les produits sont entrainés dans la circulation générale par 2 ml de soluté physiologique de chlorure de sodium.

En début de chaque expérience avec les 8056 HC, 8061 HC et 8063 HC, nous nous sommes assuré que l'éthanol à 95° (0,2 ml) était sans action.

2) Chez le Lapin et le Rat.

Conjointement à l'étude de l'action des produits sur la préparation neuromusculaire du Lapin et du Rat, leurs effets sur la pression artérielle ont été enregistrés. La canule de polythène, introduite dans la carotide de ces animaux, est reliée au manomètre PALMER (type Condon) par un tube –également de polythène– rempli cette fois de soluté physiologique de chlorure de sodium légèrement hépariné (50 U.I. d'héparine par ml de soluté physiologique).

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1) Action propre.

a) Pression artérielle:

∝) chez le Chien (Tableau XXII).

Les 8056 HC, 8061 HC, 8059 HC, 8063 HC et Para-oxon, aux doses utilisées, ne manifestent aucune action propre, hypo- ou hypertensive; ceci est mis en évidence par les Figures 36 et 38. Lors de l'administration d'une forte dose de 8061 HC (12 mg/kg: Figure 34), le niveau moyen de la pression artérielle n'est pas modifié, malgré la bradycardie intense qui se reflète sur la pression par des mouvements du style inscripteur d'une grande amplitude. Lorsque l'action propre du produit s'atténue, la bradycardie disparait et l'enregistrement de la pression redevient normal (environ 30 minutes plus tard). Le 8059 HC, même à des doses de 300 mg/kg, est sans action propre.

Contrairement à leurs homologues, les 7900 HC et 7901 HC ont une action propre hypotensive. Avec le 7900 HC (100 mg/kg), l'hypotension n'est pas très prononcée (Figure 35), mais elle se prolonge pendant 30 minutes environ. Ce produit s'hydrolyse probablement assez rapidement, car des vapeurs d'une odeur suffocante se dégagent de la patte dans laquelle l'injection a été réalisée. Avec le 7901 HC (25, 50 et 100 mg/kg: Figure 35), l'hypotension est identique à celle d'une faible dose d'ACh –donc action fugace– et la chute de pression est proportionnelle à la dose injectée. L'atropine (1 mg/kg) ne s'oppose pas à l'hypotension du 7900 HC, mais elle supprime à peu près complètement la phase hypotensive du 7901 HC, même lorsque le produit est administré à forte dose (100 mg/kg).

β) chez le Lapin: action du 8056 HC et du 8061 HC.

Le 8056 HC est doué d'une action hypotensive à retardement, c'est-à-dire qu'elle n'apparait qu'après une période de latence d'environ six minutes, correspondant à celle qu'on observe pour la potentialisation des contractions musculaires. Avec le 8061 HC, au contraire, on obtient une action hypotensive immé-

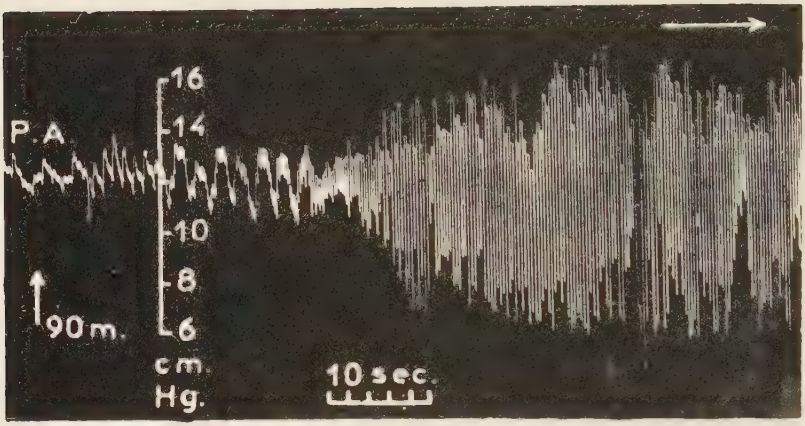


Figure 34: Action du 8061 HC sur la pression artérielle chez le Chien à t = 90 minutes, 8061 HC 12 mg/kg
(à t = 0 et 45 minutes, l'animal avait reçu une dose de 3 et 6 mg/kg du même produit).
(Cliché réduit aux 2/3)

diate qui se développe parallèlement à la potentialisation musculaire; le temps de latence est donc réduit, dans ce cas, au temps circulatoire.

La chute de pression, pour le 8056 HC comme pour le 8061 HC, est transitoire et s'accompagne d'une bradycardie importante. Le retour à la pression normale s'observe cependant après un temps beaucoup plus long que celui qui est nécessaire à la récupération de l'amplitude normale des contractions musculaires.

φ) chez le Rat:

i– thionophosphates: en début de chaque expérience, nous avons vérifié l'action du solvant; l'éthanol à 95° (0,1 ml) est un puissant hypotenseur chez le Rat (Figures 18 et 20), mais sa durée d'action est très brève (une à deux minutes).

— 7900 HC: à une dose de 25 mg/kg, l'action du 7900 HC se manifeste par une prolongation de la courbe hypotensive provoquée par l'éthanol, mais la récupération s'effectue en cinq minutes environ. A 50 mg/kg, le dérivé déclenche une baisse rapide et importante de la pression artérielle (baisse d'une dizaine de cm de mercure). Le retour s'amorce 45 minutes après l'injection et la pression revient à une valeur à peu près normale 80 minutes après l'injection.

— 8056 HC et 8057 HC: aux doses minimales potentialisatrices maximales (D.Min.P.Max.) sur la préparation nerf – muscle, ces composés produisent une hypertension artérielle très importante, mais celle-ci n'est pas immédiate. Dans nos conditions

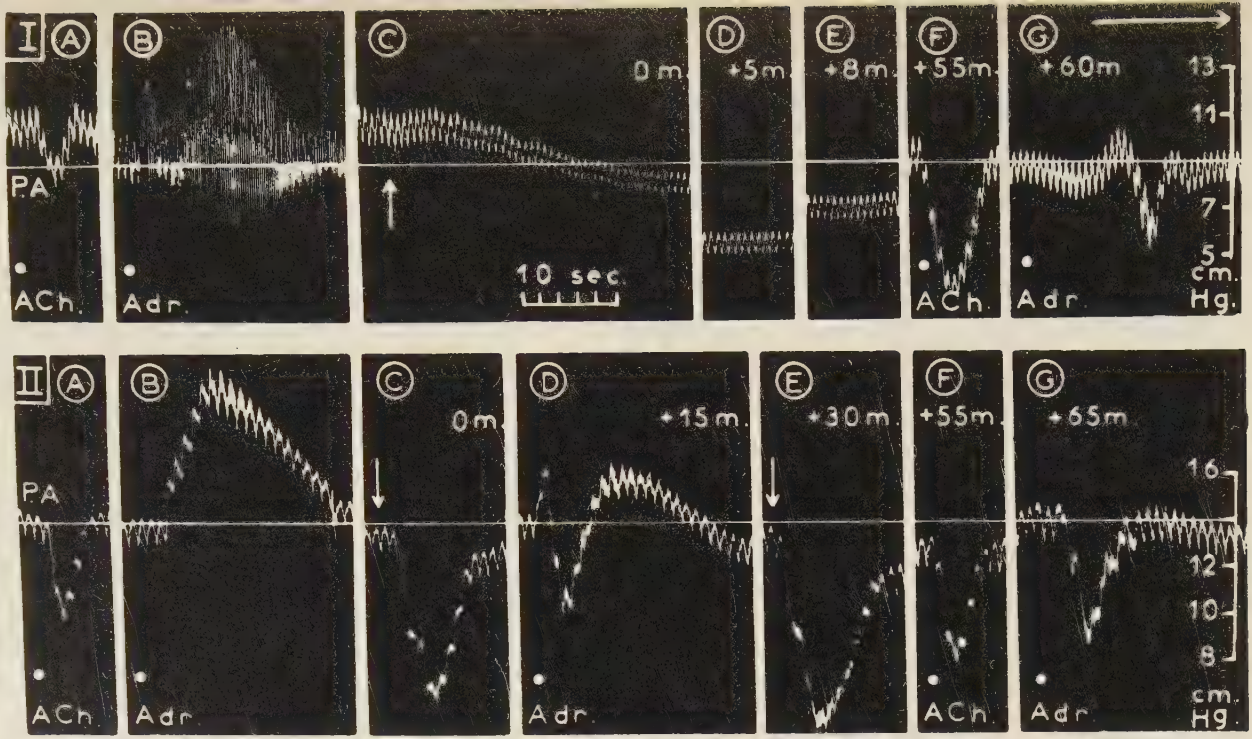


Figure 35: *Action du 7900 HC et du 7901 HC sur la pression artérielle de Chien. Influence de ces isomères sur l'hypertension adrénalinique et sur l'hypotension acétylcholinique.*

En I :	acétylcholine (ACh)	4 µg/kg	En II:	acétylcholine (ACh)	1 µg/kg
	adrénaline (Adr)	2 µg/kg		adrénaline (Adr)	3 µg/kg
	à C, 7900 HC	100 mg/kg		à C, 7901 HC	25 mg/kg
				à E, 7901 HC	100 mg/kg

(Cliché réduit aux 3/5)

d'expériences, le tracé obtenu est le suivant:
après une hypotension très prononcée mais transitoire –due aux 0,1 ml d'éthanol à 95° injecté comme solvant–, la pression se maintient à son niveau normal pendant environ cinq à six minutes; puis une hypertension rapide apparait, comparable à celle que l'on obtient avec les thiolophosphates (Figure 18). Malgré l'action potentialisatrice musculaire prolongée des thionophosphates (plusieurs heures), la courbe hypertensive est sensiblement identique à celle des thiolophosphates: après une hypertension maximale survenant 10 minutes après l'injection, une phase de décroissance débute à partir de la douzième minute environ et la pression revient à la normale en 30 à 40 minutes. Pour des fortes doses de 8056 HC, nous avons obtenu l'action triphasique (Figure 20) décrite à la page 112.

— 8059 HC et 8014 bis HC: Ces deux dérivés dithiophosphates ont une action identique à celle du 7900 HC: leur action se manifeste par une hypotension plus durable que celle du solvant seul. Ainsi, avec le 8059 HC, une dose de 50 ou 100 mg/kg provoque une hypotension de 3 ou 6 fois plus durable que celle de l'éthanol seul. Avec des doses plus fortes de ce produit, on observe, après une première hypotension, un retour vers la normale suivi d'une deuxième phase hypotensive très durable (supérieure à une heure). Avec le 8014 bis HC, pour une dose de 100 mg/kg, l'hypotension est cinq fois plus durable que celle de l'éthanol témoin.

ii– thiolophosphates:

— 7901 HC: ce produit a peu d'action sur la pression artérielle chez le Rat. Pour de fortes doses (300 mg/kg), une action hypotensive se développe lentement et parallèlement à la potentialisation des contractions musculaires.

— 8061 HC, 8062 HC, 8063 HC, 8014 HC et Para-oxon: Ces organophosphorés sont doués d'une action hypertensive très importante (Figure 18) mais, contrairement aux thionophosphates (8056 HC et 8057 HC), la période de latence avant l'apparition des effets est réduite au temps circulatoire. L'hypertension et la potentialisation musculaire atteignent leur valeur maximale en même temps, mais le retour à la normale s'effectue plus rapidement pour la pression (20 à 30 minutes) que pour le muscle (30 à 40 minutes). Comme pour les thionophosphates, on observe très souvent, avec ces composés, une phase hypotensive secondaire à la forte hypertension.

A doses très fortes, l'enregistrement de la pression artérielle s'effectue selon une courbe triphasique, comparable à celle que l'on obtient sur le muscle (Figure 20).

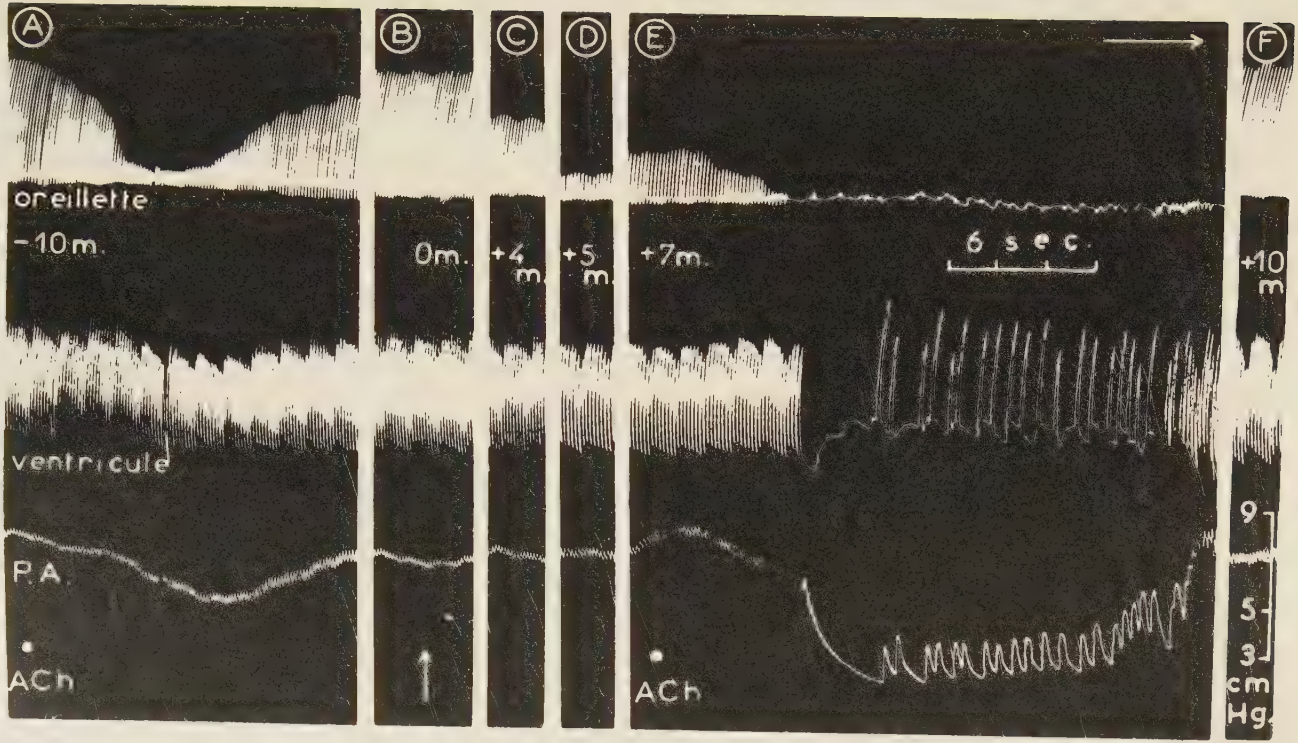


Figure 36: *Action du 8061 HC sur la pression artérielle et le coeur in situ de Chien. Influence de ce thiophosphate sur l'hypotension acétylcholinique.*

En A et E: acétylcholine (ACh) 3 µg/kg
En B : 8061 HC 1,5 mg/kg
(Cliché réduit aux 3/5)

b) coeur *in situ*.

Chez le Chien, les 8056 HC, 8061 HC, 8059 HC et 8063 HC produisent une bradycardie qui persiste souvent pendant plusieurs heures. L'effet chronotrope négatif est moins prononcé avec les thionos (8056 HC et 8059 HC) qu'avec les thiolophosphates. De plus, ces derniers, à des doses de 1,5 mg/kg pour le 8061 HC et de 2,5 mg/kg pour le 8063 HC, sont doués de propriétés inotropes négatives importantes (Figure 36): une minute après l'injection l'amplitude normale des contractions auriculaires diminue progressivement. Après trois minutes, la baisse est d'environ 75 p. 100, mais l'amplitude augmente par la suite et la récupération est ordinairement complète sept minutes après l'injection du produit. L'effet inotrope négatif est donc supprimé après ce laps de temps, mais l'effet chronotrope négatif persiste.

Numéro conventionnel H.C.	Dose mg/kg	Action propre sur			Potentialisation de l'acétylcholine sur		
			oreillette			oreillette	
		pression artérielle	chrono-trope	ino-trope	pression artérielle	chrono-trope	ino-trope
8056	1,5	nulle	-	0	+ +	-	-
	2	nulle	0	0	+ +	-	--
	4	nulle	0	0	+ + +	-	--
	4,5	nulle	-	0	+ + +	bloc complet	
8061	1,5	nulle	---	---	+ + +	bloc complet	
	12	nulle	---	---			
8059	50	nulle	0	0	+	-	-
	100	nulle	0	0	+ +	0	0
	150	nulle	--	-	+ +	-	--
	300	nulle	--	-	+ + +	-	---
8063	2,5	nulle	---	---	+ + +	-	--
Para-oxon	0,2	nulle	0	0	+ + +	-	--
7900	100	hypotension prolongée			+ + +		
7901	100	hypotension fugace			+		

Tableau XXII: *Action propre des dérivés étudiés sur la pression artérielle et le coeur in situ chez le Chien. Potentialisation des effets de l'acétylcholine.*

A la dose de 0,2 mg/kg, le Para-oxon est sans action chronotrope ou inotrope.

2) Potentialisation des effets de l'acétylcholine (chez le Chien).

Tel que mentionné précédemment, nous avons recherché les doses de produit qui augmentent les effets de l'ACh sur le système cardiovasculaire. Pour les 8056 HC, 8061 HC et 8063 HC, la demi-dose de la D.Min.P.Max.(déterminée sur la préparation neuromusculaire de Rat) s'est avérée suffisante: cette dose, douée d'une action propre sur l'oreillette pour les 8061 HC et 8063 HC, est toujours efficace pour potentialiser les effets de l'ACh, tant sur la pression que sur l'oreillette. Le Tableau XXII et la Figure 37 mettent bien en évidence cette potentialisation des effets de l'ACh.

Nous avons procédé de la même manière pour le Para-oxon: la demi-dose de la D.Min.P.Max. a été administrée.

a) sur la pression artérielle:

α) 7900 HC et 7901 HC:

Le 7900 HC, à une dose de 100 mg/kg, potentialise les effets hypotenseurs de l'ACh (Figure 35); la potentialisation maximale obtenue a été de 80 p. 100. L'action de ce dérivé est durable, puisque la potentialisation de l'hypotension acétylcholinique ne disparait que deux heures après l'injection du produit. Par contre, le 7901 HC, même à 100 mg/kg, a peu d'effet sur l'action hypotensive de l'ACh (Figure 35).

La figure 35 montre aussi l'action de ces produits vis-à-vis de l'hypertension adrénalinique. Des résultats très discordants ont été obtenus: parfois, ces composés diminuent la réaction à l'adrénaline, parfois ils sont sans effets. D'autres expériences devront donc être réalisées si l'on veut déterminer avec précision les actions de ces produits sur l'hypertension adrénalinique.

β) 8056 HC, 8061 HC, 8059 HC, 8063 HC et Para-oxon:

Ces dérivés, à des doses respectives de 2, 1,5, 150, 2,5 et 0,2 mg/kg, potentialisent l'action hypotensive de l'ACh, tant en amplitude (chute plus prononcée de la pression artérielle) qu'en durée ("élargissement" de la courbe hypotensive). Sur la Figure 37, nous avons représenté graphiquement ces potentialisations: en abcisses figure le temps en minute et, en ordonnées, le pourcentage d'augmentation par rapport à l'hypotension acétylcholinique témoin. Cette représentation graphique, bien que sans grande valeur pharmacologique, permet néanmoins de suivre l'évolution de l'action et facilite les comparaisons entre les thionos (8056 HC et 8059 HC) et les thiolos (8061 HC et 8063 HC). Dans le Tableau XXII, nous avons indiqué le degré de potentialisation, permettant ainsi de comparer l'action obtenue en fonction de la dose et aussi en fonction du produit.

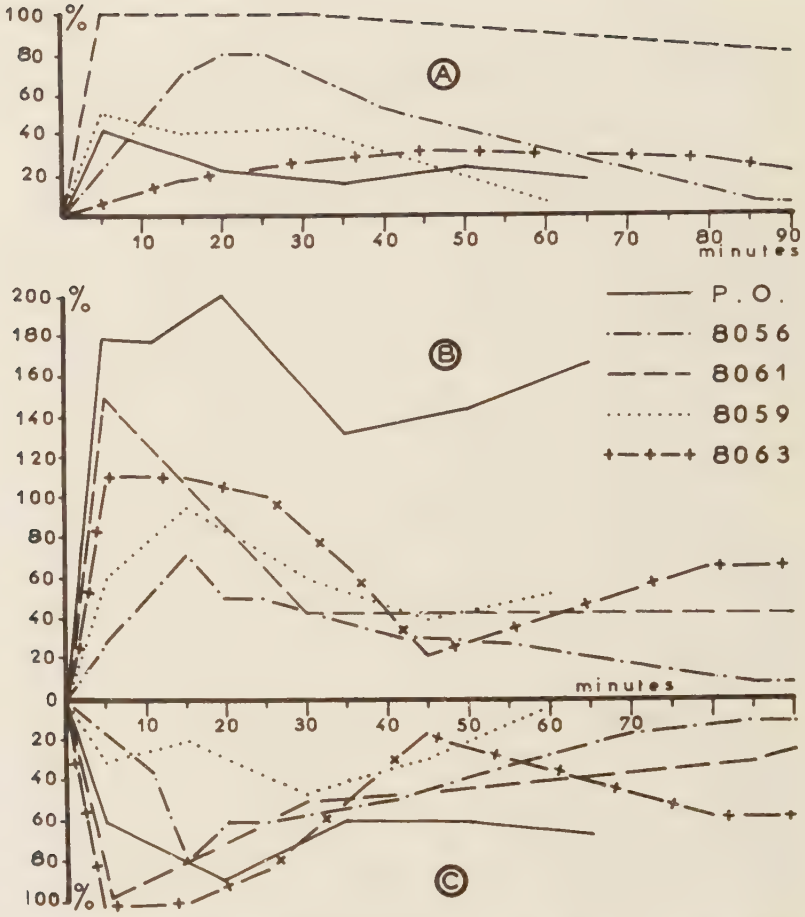


Figure 37: *Courbes de potentialisation des effets de l'ACh chez le Chien par les dérivés étudiés: potentialisation de l'action inotrope négative sur l'oreillette (A) potentialisation de l'amplitude (B) et de la durée (C) de l'hypotension.*

Si on injecte des doses inférieures ou supérieures à celles que nous avons mentionnées, l'effet est alors moins ou plus important: il y a proportionnalité entre l'intensité de l'action et la dose injectée.

Des résultats représentés dans le Tableau XXII et dans la Figure 37, on peut déduire les faits suivants:

i– période de latence:

— thionos: les 8056 HC et 8059 HC nécessitent un temps de latence d'environ 15 minutes pour produire leur effet maximal.

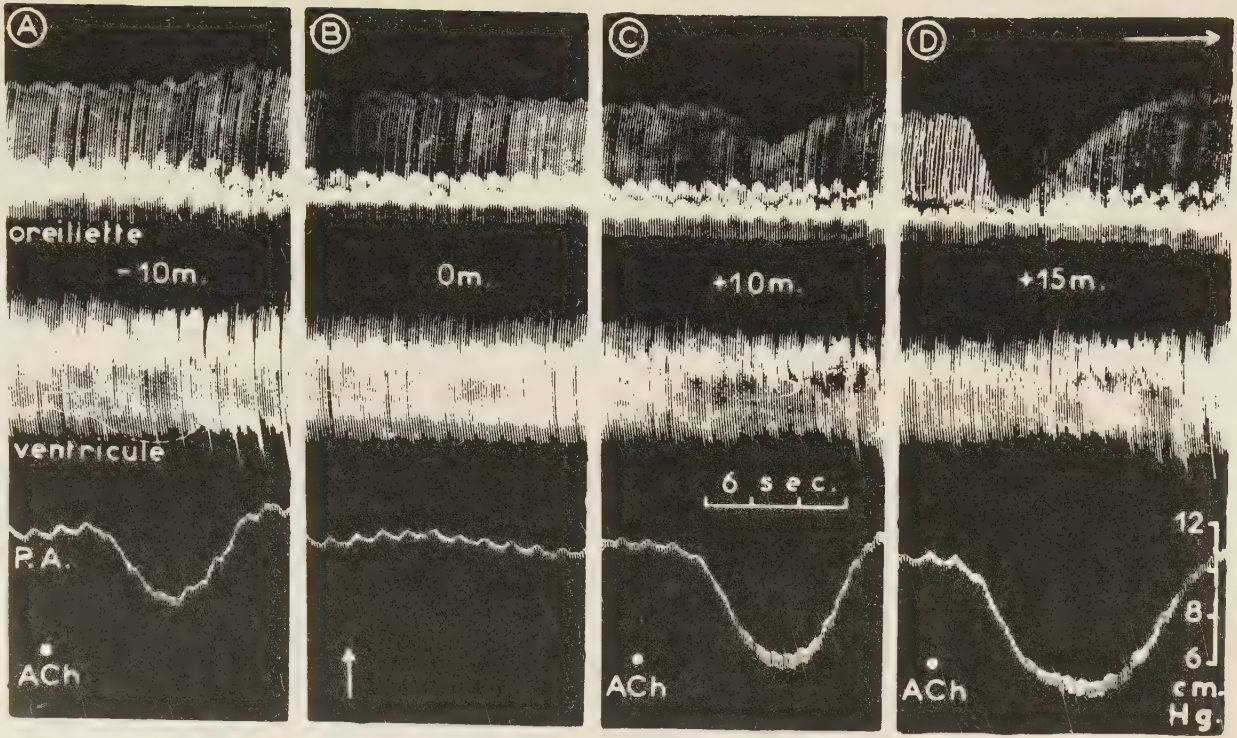


Figure 38: *Action du 8056 HC sur la pression artérielle et le coeur* in situ *chez le Chien. Influence de ce dérivé sur l'hypotension acétylcholinique.*

En A, C, D : acétylcholine (ACh) 0,5 µg/kg
En B : 8056 HC 2 mg/kg
(Cliché réduit aux 2/3)

La Figure 38 permet de suivre le développement de l'action potentialisatrice de l'ACh, après l'injection du 8056 HC (2 mg/kg): ainsi, 10 minutes après l'injection, l'hypotension augmente de 50 p. 100, atteint 70 p. 100 cinq minutes plus tard, puis elle diminue. Pour le 8059 HC, on obtient des résultats analogues: l'effet est maximal 15 minutes après l'administration d'une dose de 150 mg/kg.

— thiolos: l'effet maximal des 8061 HC et 8063 HC, au contraire, est immédiat. Ceci se vérifie d'ailleurs sur la Figure 36 et sur la Figure 37: 5 minutes après l'administration d'un de ces dérivés, à des doses respectives de 1,5 et 2,5 mg/kg, l'augmentation de l'hypotension acétylcholinique est de 150 et 110 p. 100.

Le Para-oxon a une action identique à celle des thionos.

L'évolution de l'action de ces dérivés, c'est-à-dire le temps nécessaire à l'obtention de l'effet maximal, est identique tant sur l'amplitude de l'hypotension que sur sa durée. Cependant, la potentialisation de l'action de l'acétylcholine est plus prononcée sur la première que sur la seconde. Avec le 8061 HC et le Para-oxon, par exemple, l'amplitude de l'hypotension est augmentée de 150 et 180 p. 100, alors que la durée ne l'est que de 100 et 90 p. 100.

ii– durée d'action:

La durée d'action des thiolos est sensiblement identique à celle des thionos: elle se prolonge pendant deux heures et plus. Lorsque l'effet maximal est atteint, on obtient parfois un plateau (8063 HC: Figure 37) qui se maintient pendant quelques minutes puis, à une phase décroissante rapide fait place une diminution secondaire beaucoup plus lente.

Avec certains dérivés comme le 8059 HC, le 8063 HC et le Para-oxon, on obtient un phénomène particulier: celui d'une action en double cloche (Figure 37). En effet, après une première décroissance de l'activité potentialisatrice, on observe une reprise de la potentialisation de l'ACh, moins prononcée que l'action initiale, mais assez prolongée.

iii– On peut se demander si l'action du 8059 HC –utilisé à un degré de pureté de 95 p. 100– ne résulterait pas des impuretés (par exemple des traces d'isomères) qu'il contient. De plus, la dose injectée est tellement supérieure à celle de son isomère, le 8063 HC (60 fois plus forte), que les résultats obtenus avec ce dérivé nous semblent peu significatifs.

b) sur l'oreillette.

Les thionos (8056 HC et 8059 HC), tout comme les thiolos (8061 HC et 8063 HC) et le Para-oxon, potentialisent les effets inotropes négatifs de l'ACh (Figures 37 et 38). Comme sur la pression artérielle, l'action du 8056 HC n'est maximale que

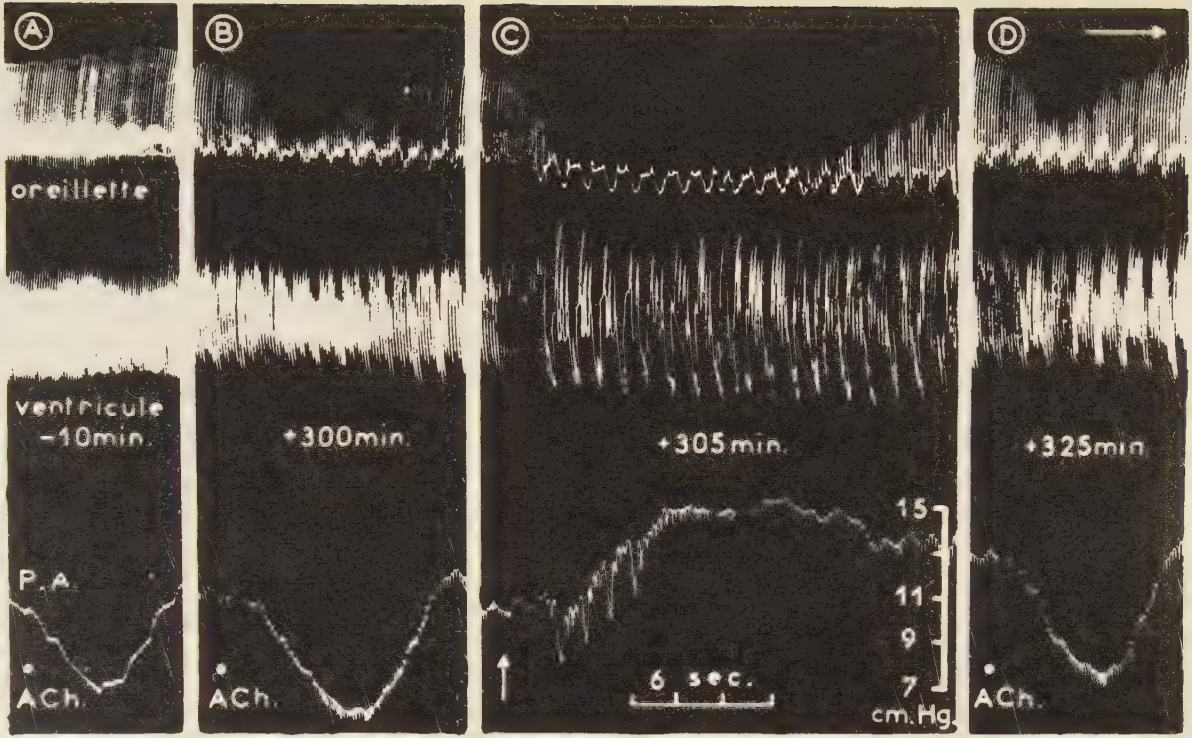


Figure 39: *Essai de réactivation par le méthylsulfate de Pralidoxime: action propre du réactivateur.*
(Préparation pression artérielle – coeur in situ de Chien)
(Cliché réduit aux 2/3)

En A, B, D: acétylcholine (ACh) 1 µg/kg
En C : Pralidoxime 20 mg/kg
(à t = 0, 60 et 200 minutes, l'animal a reçu une dose de 2 mg/kg du 8056 HC).

plusieurs minutes après l'injection, mais les thiolophosphates augmentent presqu'instantanément l'action inotrope négative de l'ACh. Si une dose témoin d'ACh est injectée au moment où l'action inotrope négative du composé (8061 HC et 8063 HC) atteint son maximum, on obtient un blocage auriculaire complet (Tableau XXII et Figure 36).

3) Essai de réactivation par le méthylsulfate de Pralidoxime.

a) Chez le Rat.

Le Pralidoxime, sans action propre sur la pression artérielle de Rat,

– ne modifie pas ou modifie peu la forte hypertension produite par les thionos et les thiolophosphates actifs sur la préparation neuromusculaire,

– s'oppose à l'hypotension consécutive à la forte hypertension initiale,

– antagonise l'hypotension obtenue pour les fortes doses de 7901 HC et ramène la pression à une valeur à peu près normale. L'action de ce réactivateur, au niveau vasculaire, est donc beaucoup moins prononcée que celle que nous avons décrite au niveau musculaire.

b) Chez le Lapin.

L'hypotension engendrée par le 8061 HC est antagonisée par le Pralidoxime. Celui-ci ramène non seulement la pression à sa valeur normale, mais encore entraine une légère hypertension

c) Chez le Chien.

Malgré de nombreux essais (Figure 39), nous n'avons jamais pu mettre en évidence une action antagoniste de la potentialisation de l'acétylcholine sur le système cardiovasculaire, même pour des doses de 10, 20 et 40 mg/kg de ce réactivateur (DL 50 par voie intraveineuse chez la Souris: 140 mg/kg). L'action potentialisatrice des effets de l'acétylcholine sur la pression artérielle ou sur l'oreillette s'en trouve parfois légèrement diminuée, mais elle n'est jamais supprimée.

Le méthylsulfate de Pralidoxime a une action hypertensive propre chez le Chien (G. Cheymol [1962]). Lors des essais de réactivation, nous l'avons nous-même constaté (Figure 39). Cependant, il possède également des actions inotrope et chronotrope négatives très importantes: sur l'oreillette, on obtient un effet identique à celui produit par une forte dose d'acétylcholine, c'est-à-dire un blocage auriculaire complet, qui se maintient pendant plusieurs secondes..

CHAPITRE III

ACTION DES ANTICHOLINESTÉRASIQUES SUR LES MUSCLES LISSES: INTESTIN.

I°– GÉNÉRALITÉS.
1) Cholinestérases intestinales.

2) Actions générales sur le tractus gastro-intestinal.
a) action indirecte, due à l'inhibition des cholinestérases.
b) action directe sur les muscles lisses.

3) Antagonismes.

II°– MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.
1) *In situ:* intestin de Chien.

2) *In vitro:* iléon de Cobaye.
a) action propre des produits étudiés.
b) action sur l'effet contracturant de l'acétylcholine.
c) antagonismes.

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.
1) *In situ* chez le Chien.
a) action propre.
b) potentialisation des effets de l'acétylcholine
c) antagonismes.

2) *In vitro* sur l'iléon de Cobaye.
a) action propre.
b) action sur la contracture par l'acétylcholine.
c) antagonismes.

IV°– ESSAI D'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

I°– GÉNÉRALITÉS.

L'activité intestinale est très sensible à l'influence des anticholinestérasiques: dans les cas d'intoxications, des douleurs abdominales, qui figurent parmi les premiers symptômes, résultent de spasmes intestinaux très intenses.

1) Cholinestérases intestinales.

KOELLE [1953] a mis en évidence, chez le Lapin, la présence:

— d'AChE
- –dans tout le tissu nerveux de la paroi intestinale,
- –en faible concentration dans les cellules interstitielles des différentes couches musculaires.

— de BuChE
- –dans les cellules ganglionnaires,
- –dans les cellules interstitielles,
- –dans les muqueuses.

Sur l'intestin de Chat, KOELLE et coll. [1950] ont montré avec le DFP que, pour des concentrations entrainant de fortes augmentations de tonus, l'inhibition des BuChE est presque complète, alors que les AChE conservent une activité à peu près normale. De ces observations, ces auteurs concluent que la motilité intestinale est associée étroitement à l'activité des BuChE, conclusion qui fut confirmée par des travaux de BURN et coll [1952]. Ces résultats suggèrent que la BuChE contrôlerait le taux d'ACh d'origine tissulaire (FELDBERG et LIN [1949]), c'est-à-dire le tonus intestinal lui-même. Il ne faut cependant pas mettre en doute le rôle essentiel de l'AChE, puisque l'augmentation du tonus du duodénum isolé de Lapin, traité au DFP, coincide avec l'inhibition complète des AChE, l'inhibition totale des BuChE survenant pour une concentration beaucoup plus faible (SHELLEY [1955]).

2) Actions générales sur le tractus gastro-intestinal.

HARNACK et WITKOWSKI [1876] ont montré les premiers que l'ésérine augmente le péristaltisme stomacal et intestinal. Sur le duodénum, très sensible aux antiChE, les organophosphorés provoquent une augmentation du tonus et de la rythmicité, même à des doses inactives sur la circulation ou la respiration (KROPP et KUNKEL [1954]). Pour des doses plus fortes, on observe des contractions spastiques duodénales intenses.

Sur l'intestin isolé, des doses croissantes d'antiChE produisent successivement les phénomènes suivants:

- – augmentation de la motilité pendulaire,
- – augmentation du tonus et du péristaltisme, et finalement,
- – inhibition et paralysie de la motilité intestinale.

Ces effets sur l'intestin sont entièrement réversibles par lavage de la préparation avec la solution de TYRODE.

Les antiChE organophosphorés auraient, sur l'intestin, une action double:

a) action indirecte due à l'inhibition des cholinestérases:

ADMIRAAL et coll. [1955] ont déterminé la relation entre l'inhibition des ChE et les effets pharmacologiques. Ils ont obtenu les résultats suivants:

- inhibition de 25 p. 100: augmentation de la motilité des muscles longitudinaux,
- inhibition de 40 p. 100: augmentation de la motilité des muscles circulaires,
- inhibition de 80 p. 100: apparition du péristaltisme.

b) action directe sur les muscles lisses:

De fortes concentration d'organophosphorés inhibent complètement la motilité intestinale, au lieu de l'augmenter (HEATHCOTE [1932], SHELLEY [1955]). Cet effet paralytique est réversible au lavage, mais n'est pas modifié ni par l'atropine, ni par le Pralidoxime (ERDMANN et HEYE [1958]). Les antiChE agiraient donc directement sur les muscles lisses.

3) **Antagonismes.**

L'atropine, le Pralidoxime et les ganglioplégiques préviennent l'augmentation de motilité et de tonicité intestinales, généralement provoquée par les antiChE. L'action des ganglioplégiques suggère que les effets sont dûs en partie à l'accumulation d'ACh au niveau des ganglions autonomes de la paroi intestinale (ERDMANN et HEYE [1958]).

II°– MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.

1) *In situ:* **Intestin de Chien.**

Parallèlement à l'enregistrement de la pression artérielle et des contractions du coeur *in situ* chez le Chien, nous avons vérifié l'action sur l'intestin des 8056 HC, 8061 HC, 8059 HC, 8063 HC et Para-oxon.

La préparation se fait de la manière suivante: on incise, sur une longueur de quatre à cinq cm, la peau et les muscles de la partie médiane de l'abdomen; on introduit, dans une anse intestinale, un ballonnet de caoutchouc rempli d'eau et relié à une ampoule à décantation –également remplie d'eau jusqu'aux deux tiers supérieurs– par un tube en polyéthylène de faible diamètre intérieur. La partie supérieure de l'ampoule est elle-même reliée par un tube de caoutchouc à un tambour inscripteur de MAREY.

2) *In vitro:* iléon de Cobaye.

Nous avons utilisé la méthode de MAGNUS [1904] appliquée à l'iléon isolé de Cobaye –animaux mâles, non à jeun, d'un poids de 200 à 300 g–. On prélève une portion de 1,5 cm d'iléon; après lavage de la paroi interne, on suspend ce fragment dans un bain contenant 25 ml de solution de TYRODE oxygéné, maintenue à une température de 37° C. La composition de cette solution de TYRODE est la suivante:

chlorure de sodium	8 g
chlorure de potassium	0,2 g
chlorure de calcium (anhydre)	0,1 g
chlorure de magnésium	0,1 g
carbonate acide de sodium	0,5 g
glucose	0,5 g
eau distillée	q.s.p.1000 ml

On enregistre les mouvements de l'intestin grâce à un style inscripteur relié par un fil au fragment d'iléon.

mode opératoire: après une période de repos de 30 minutes environ, pendant laquelle la préparation se stabilise, on vérifie la sensibilité de celle-ci en la soumettant à l'action contracturante de l'acétylcholine (0,01 à 1 μg pour un bain de 25 ml). On laisse en contact pendant une minute, puis on lave avec 100 ml de solution de TYRODE; le même cycle d'opérations peut être répété toutes les trois minutes.

a) action propre des produits étudiés:

On ajoute au bain des quantités croissantes d'organophosphorés. On laisse agir pendant cinq minutes, puis on lave la préparation. L'action de nouvelles doses de produit est essayée toutes les dix minutes.

Le 8056 HC est peu soluble dans l'eau. Ce composé est donc dissout à 0,005 p. 100 dans une solution de TYRODE à 37°C. En raison de la faible concentration en produit de cette solution, l'addition de la quantité désirée de 8056 HC n'a pu être faite sans apport d'un volume important de solution. Afin de ne pas modifier le volume final du bain, un même volume de solution de TYRODE a été préalablement retiré, juste avant l'addition dù produit. Ainsi, 250 μg du 8056 HC sont solubilisés dans cinq ml de liquide de TYRODE; avant l'addition d'une telle dose, nous avons donc soustrait 5 ml de liquide du bain.

b) action sur l'effet contracturant de l'acétylcholine:

Après avoir obtenu trois contractions identiques par une même concentration d'ACh, on ajoute la quantité d'organophosphoré suivi, une, trois ou cinq minutes plus tard, de l'ACh qu'on laisse agir pendant une minute avant de laver la préparation.

c) antagonisme:

Après étalonnage des contractures obtenues, d'une part, avec l'ACh et, d'autre part, avec le chlorure de baryum (0,1 à 0,3 mg pour un bain de 25 ml) en présence de doses croissantes d'atropine dans le premier cas ou de papavérine dans le second, on vérifie l'action antagoniste à titre préventif et à titre curatif du parasympatholytique, du spasmolytique et du réactivateur (le méthylsulfate de Pralidoxime) sur les contractions spontanées et sur la contracture obtenues par l'organophosphoré.

– antagonisme à titre préventif: on recherche la concentration d'organophosphoré pour laquelle on observe une action propre. Lorsque celle-ci est déterminée, on fait agir des doses croissantes d'atropine, de papavérine ou de Pralidoxime pendant une minute, puis on ajoute l'antiChE. Après cinq minutes de contact, on lave la préparation. On encadre cet enregistrement par celui de l'action propre de l'organophosphoré.

– antagonisme à titre curatif: on ajoute au bain la quantité d'antiChE pour laquelle se manifeste une action propre. On laisse agir pendant cinq minutes, puis on ajoute l'antagoniste; on enregistre encore pendant cinq minutes et on lave la préparation.

L'étude sur l'iléon isolé de Cobaye a été entreprise avec deux isomères de la série étudiée:

- le 8056 HC, dérivé thionophosphate,
- le 8061 HC, dérivé thiolophosphate.

III°– RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1) *In situ* chez le Chien.

a) action propre:

Après une période de latence correspondant, pour les thiolos (8061 HC et 8063 HC) et le Para-oxon, au temps circulatoire et, pour les thionos (8056 HC et 8059 HC) à une quinzaine de minutes, les organophosphorés –sauf le 8059 HC qui est presqu'inactif– augmentent le péristaltisme intestinal et entrainent soit une augmentation du tonus qui se maintient pendant plusieurs heures (8056 HC et Para-oxon), soit une véritable contracture (8061 HC et 8063 HC). Les résultats sont réunis dans le Tableau XXIII.

Ainsi, à une dose de 2,5 mg/kg, le 8063 HC provoque une élévation de tonus. L'effet maximal est obtenu quatre minutes après l'injection, mais la récupération est complète 25 minutes plus tard. Cependant, dans ce cas, nous avons noté une reprise de l'action sur l'intestin, se manifestant par une nouvelle augmentation du tonus et survenant parallèlement à la reprise de l'action cardiovasculaire (Figure 37).

Numéro conventionnel H.C.	Dose mg/kg	Latence (min)	augmentation du	
			tonus	péristaltisme
8056	2	15	+ +	+ +
8061	1,5	2	+ + +	+ +
8059	200	-	0	0
8063	2,5	2	+ + +	+ +
Para-oxon	0,2	2	+ +	+ +

Tableau XXIII: *Action de cinq organophosphorés sur le tonus et le péristaltisme intestinal chez le Chien.*

Lors d'une expérience avec le 8061 HC (Figure 40), nous avons administré des doses de 3, 6 et 12 mg/kg à 45 minutes d'intervalle. Des résultats obtenus, on peut déduire que l'effet observé est proportionnel à la dose injectée. Cependant, cette proportionnalité se manifeste moins sur l'amplitude de la contracture que sur le temps nécessaire à l'obtention de l'effet maximal et sur la durée d'action du produit. Ainsi, pour 3 mg/kg, l'effet maximal est atteint après quatre ou cinq minutes, mais la

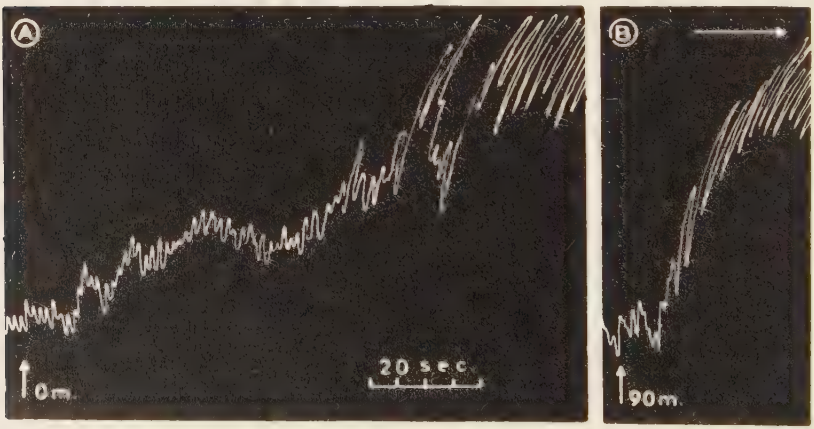


Figure 40: *Action du 8061 HC sur l'intestin* in situ *chez le Chien.*.
En A: à t = 0 minute, 8061 HC 3 mg/kg
En B: à t = 90 minutes, 8061 HC 12 mg/kg
(à t = 45 minutes, l'animal avait reçu une dose de 6 mg/kg du même produit).
(Cliché réduit aux 7/15)

récupération est totale après trente minutes. Pour 12 mg/kg, la contracture est maximale en une ou deux minutes, mais le tonus n'est pas revenu à sa valeur normale 45 minutes après l'injection; de plus, les perturbations (contractions spontanées d'une grande amplitude, péristaltisme très augmenté) sont encore importantes.

b) potentialisation des effets de l'acétylcholine:

Dans le cas des 8056 HC et 8061 HC, l'action de l'ACh est légèrement potentialisée. Cette potentialisation se manifeste par une paralysie transitoire: inhibition du péristaltisme et chute du tonus.

c) antagonisme:

Le méthylsulfate de Pralidoxime est sans action sur les perturbations provoquées par les organophosphorés au niveau intestinal. Au contraire, on note même, au moment de l'injection, une exagération du péristaltisme.

2) *In vitro* sur l'iléon de Cobaye.

a) action propre:

α) thionophosphate: 8056 HC (Figure 41).

Aux faibles concentrations (inférieures à 2 μg/ml, aucune action propre ne se manifeste. Cependant, avec une augmentation de la concentration (4 μg/ml jusqu'à 20 μg/ml) apparait une chute du tonus, proportionnelle à la dose, mais réversible au lavage.

β) thiolophosphate: 8061 HC (Figures 42 et 43).

A partir d'une concentration de 0,1 μg/ml, le 8061 HC possède une action propre qui consiste en une augmentation du péristaltisme, mais sans modification du tonus. Pour une concentration de 0,2 μg/ml, le péristaltisme est plus important et s'accompagne d'une légère élévation du tonus. A partir de 0,3 μg/ml, les mouvements péristaltiques se transforment peu à peu en contractions spontanées d'une grande amplitude et s'accompagnent d'une élévation de plus en plus grande du tonus; pour 0,4 μg/ml, on obtient une véritable contracture.

Le temps de latence nécessaire à l'apparition de l'action est inversement proportionnel à la concentration en 8061 HC du bain: il est d'environ trois minutes pour 0,1 μg/ml, de quelques secondes pour 0,4 μg/ml et pratiquement nul pour 4 μg/ml.

L'action de ce dérivé est complètement réversible au lavage et le tonus de base est récupéré très rapidement. Cependant, il est souvent nécessaire de laver avec des quantités plus importantes de liquide de TYRODE (200 et parfois 300 ml). Sur la

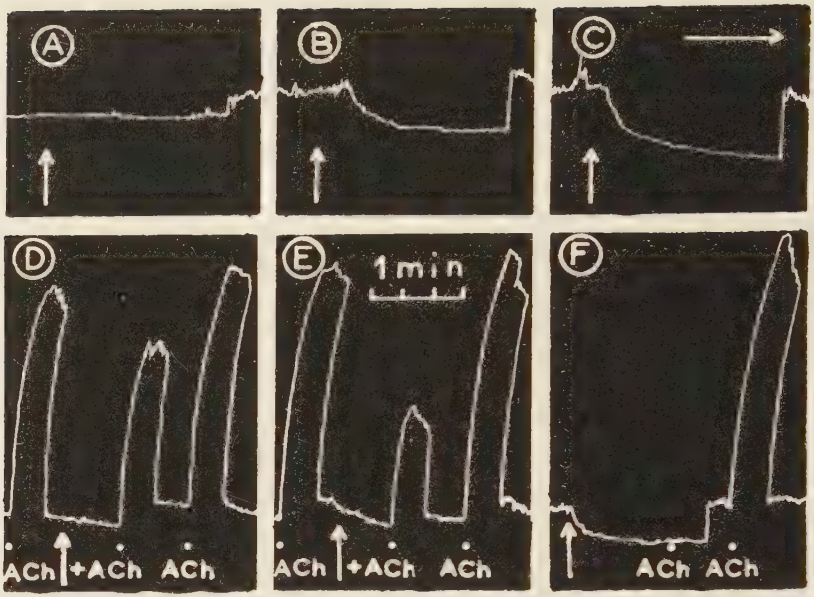


Figure 41: *Action du 8056 HC sur l'iléon isolé de Cobaye. Action propre et action sur la contracture par l'acétylcholine.*

En A et D: à ↑	8056 HC	1 µg/ml
En B et E: à ↑	8056 HC	4 µg/ml
En C et F: à ↑	8056 HC	20 µg/ml
ACh: acétylcholine		0,004 µg/ml

(Cliché réduit aux 2/3)

même préparation, ces phénomènes sont parfaitement reproductibles; parfois, une légère action de sommation des doses apparait.

b) action du 8061 HC et du 8056 HC sur la contracture par l'acétylcholine.

α) thionophosphate: 8056 HC (Figure 41).

Ce dérivé diminue l'action contracturante de l'acétylcholine. Cette inhibition est déjà de 50 p. 100 pour une concentration de 2 µg/ml et est complète pour 8 µg/ml.

β) thiolophosphate: 8061 HC (Figure 42).

Ce dérivé potentialise l'action contracturante de l'acétylcholine sur l'intestin, mais cette potentialisation est faible. Elle n'apparait que si le temps de contact entre l'organophosphoré et la préparation est assez prolongé (trois à cinq minutes), et seulement pour des concentrations capables d'engendrer une action propre. Cependant, ce dérivé semble s'éliminer facilement

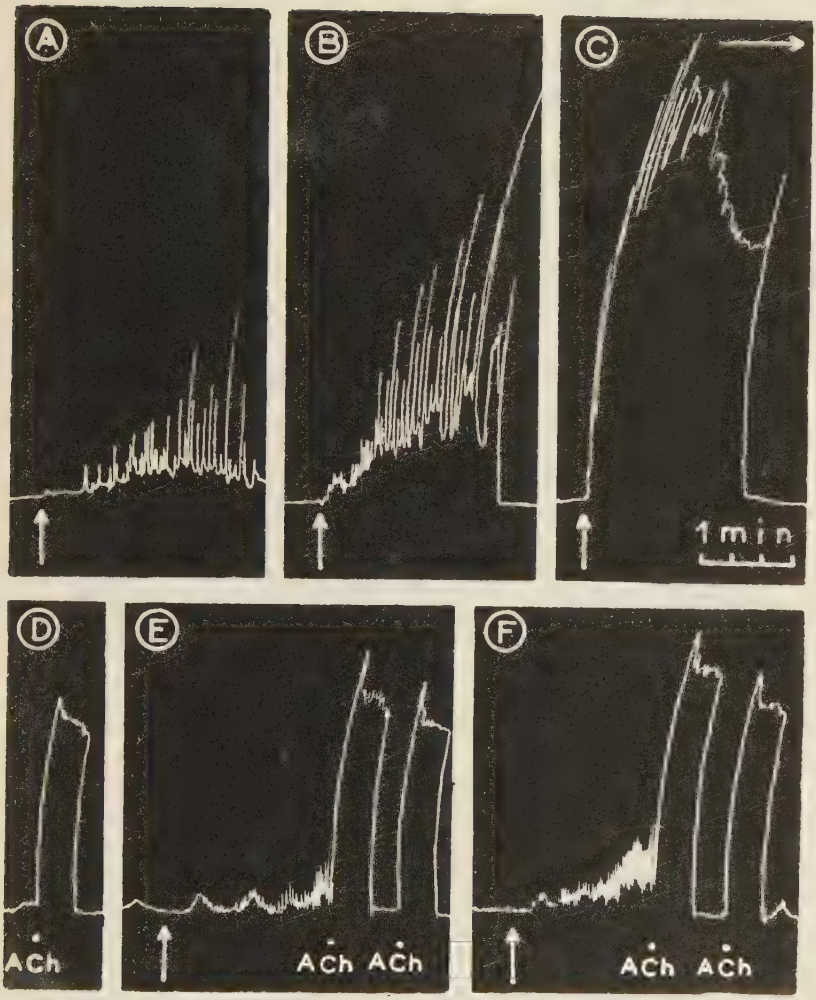


Figure 42: *Action du 8061 HC sur l'iléon isolé de Cobaye. Action propre et action sur la contracture par l'acétylcholine.*

En A et E:	à ↑ ,	8061 HC	0,2 µg/ml
En B	: à ↑ ,	8061 HC	0,4 µg/ml
En C	: à ↑ ,	8061 HC	4 µg/ml
En D	:	acétylcholine (ACh)	0,004 µg/ml
En F	: à ↑ ,	8061 HC	0,3 µg/ml

(Cliché réduit aux 2/3)

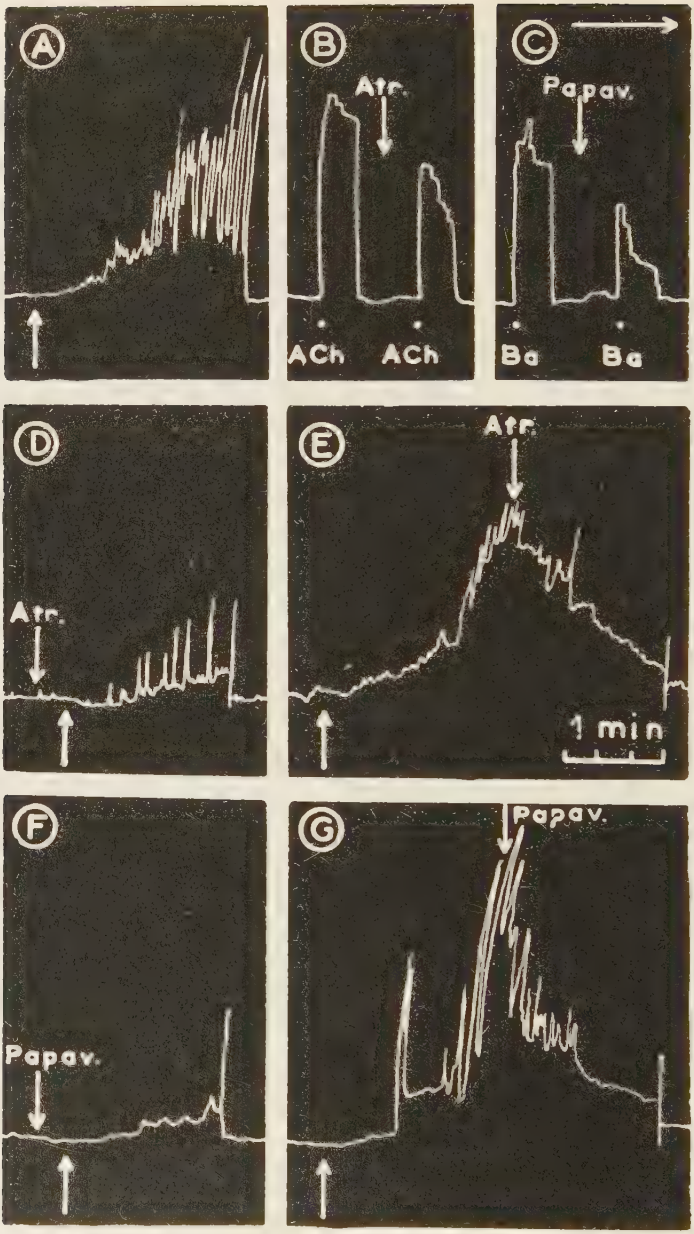


Figure 43: *Antagonisme à titres préventif et curatif de l'atropine et de la papavérine vis-à-vis du 8061 HC.*

En A, D, E, F, G: à ↑ , 8061 HC 0,4 µg/ml
acétylcholine (ACh) 0,004 µg/ml chlorure de baryum (Ba) 4 µg/ml
sulfate d'atropine (Atr.) 0,002 µg/ml papavérine (Papav.) 2 µg/ml

(Cliché réduit aux 8/11)

au lavage, puisque la contracture normale par l'acétylcholine est obtenue après la deuxième ou la troisième addition d'ACh.

L'action potentialisatrice du 8061 HC sur la contracture à l'ACh n'a pas été étudiée avec des concentrations supérieures à 0,3 µg/ml, car l'action propre du produit est alors beaucoup trop importante pour permettre la dissociation des deux actions.

c) antagonismes.

L'antagonisme de l'atropine ou de la papavérine (Figure 43) vis-à-vis du 8061 HC n'apparait que pour des concentrations capables de diminuer la contracture témoin obtenue d'une part avec l'ACh ou, d'autre part, avec le chlorure de baryum. Pour une même concentration d'antagoniste, les deux actions sont qualitativement et souvent quantitativement identiques: à une inhibition totale de la contracture témoin par l'acétylcholine ou par le chlorure de baryum qu'exerce 0,04 µg/ml d'atropine ou 3 µg/ml de papavérine correspond une suppression totale des effets du 8061 HC. Les concentrations d'atropine inhibant d'environ 50 p. 100 la contracture par l'ACh ou par le 8061 HC varient entre 0,002 et 0,003 µg/ml; celles de la papavérine vis-à-vis de la contracture par le chlorure de baryum ou par le 8061 HC varient entre 1 et 2 µg/ml.

La Figure 43 montre que l'action antagoniste de l'atropine ou de la papavérine apparait tant à titre préventif qu'à titre curatif.

Le méthylsulfate de Pralidoxime, à faible concentration (0,4 µg/ml) potentialise les effets du 8061 HC. Cependant, à partir de 4 µg/ml, le Pralidoxime manifeste une faible action antagoniste (Figure 44). Celle-ci n'est cependant pas proportionnelle à la dose, puisque des concentrations de 4, 20, 40 ou 80 µg/ml du réactivateur ne modifient que très peu la pente du retour à la normale. Nos résultats sont en accord avec les expériences de BETHE et coll. [1957] selon lesquelles le Pralidoxime, à faible concentration, sensibilise l'intestin à l'ACh en inhibant les cholinestérases, alors qu'à fortes concentrations, il antagonise l'ACh.

IV°– ESSAI D'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

L'analyse des résultats permet de constater que les deux isomères, le 8056 HC et le 8061 HC, possèdent, *in vitro*, une action complètement opposée: alors que le premier entraine une baisse de tonus et une action à composante probablement parasympatholytique, le second possède une action contracturante

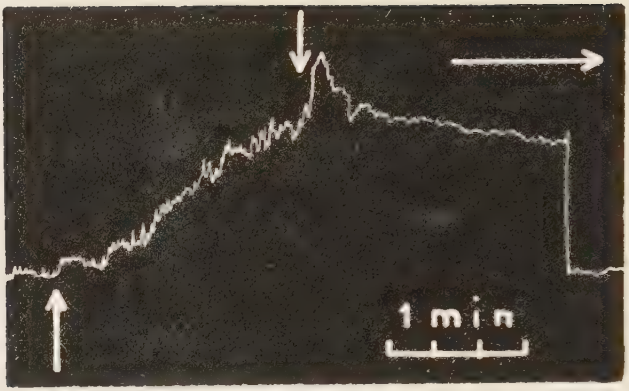


Figure 44: *Action du méthylsulfate de Pralidoxime sur la contracture par le 8061 HC.*

à ↑	: 8061 HC	0,4 µg/ml
à ↓	: Pralidoxime	20 µg/ml

assez prononcée et potentialise –faiblement– l'action contracturante de l'acétylcholine. Les effets du 8056 HC sont donc liés à la configuration chimique de la molécule, puisque le 8056 HC est inactif comme inhibiteur des cholinestérases *in vitro* et que, de plus, les organophosphorés à propriétés antiChE, sont doués, sur les muscles lisses, d'effets propres opposés. Quant au 8061 HC, les résultats semblent indiquer:

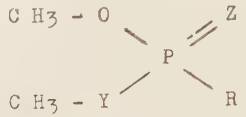
– une action antiChE, se manifestant par une augmentation du péristaltisme et finalement par une contracture. L'antagonisme de l'atropine s'expliquerait alors plus par son action parasympatholytique que par son action spasmolytique,

– une action directe sur le muscle lisse, puisque la papavérine possède une action antagoniste vis-à-vis du 8061 HC, de la même manière que vis-à-vis du chlorure de baryum.

Bien que le 8056 HC et le 8061 HC aient, *in vitro,* une action totalement opposée, ces deux composés ont, *in vivo,* une action comparable: celle du 8061 HC se manifeste immédiatement, tandis que celle du 8056 HC se développe lentement. L'action de ces dérivés, non seulement sur l'intestin mais encore sur tout le système nerveux autonome, confirme donc les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de ces produits sur la préparation neuro-musculaire: d'une part, le temps de latence du 8056 HC (thionophosphate) est toujours supérieur à celui du 8061 HC (thiolophosphate) et, d'autre part, le premier est inactif *in vitro,* alors que le second manifeste son activité *in vitro* et *in vivo.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre étude a porté sur dix dérivés soufrés de l'acide orthophosphorique trisubstitué, principalement sur les rapports entre la structure chimique –formes "thiono" et "thiolo"– et l'activité pharmacodynamique. Ces composés, réunis dans le Tableau XXIV, répondent à la formule générale suivante (Formule XXII):



(XXII)

Thionophosphates		Thiolophosphates
Y = oxygène Z = soufre	R	Y = soufre Z = oxygène
7900 HC	$-O-CH_3$	7901 HC
8056 HC		8061 HC
8057 HC		8062 HC
8059 HC	$-S-CH(CH_2-COO-C_2H_5)-COO-C_2H_5$	8063 HC
8014 bis HC	$-S-CH_2-CO-NH-CH_3$	8014 HC

Tableau XXIV: *Constitution chimique des dérivés de la série étudiée.*

Parmi les thionophosphates, seul le 7900 HC a été synthétisé à l'Institut de Pharmacologie; les quatre autres, connus commercialement sous le nom de

- Méthylparathion (8056 HC) } mono-
- Sumithion (8057 HC) } thiophosphates
- Malathion (8059 HC) } di-
- Diméthoate (8014 bis HC) } thiophosphates

nous ont été fournis gracieusement par les laboratoires Péchiney-Progil. Les cinq thiolophosphates (7901 HC, 8061 HC, 8062 HC, 8063 HC et 8014 HC) ont été préparés à partir des thionophosphates, suivant le procédé de synthèse mis au point dans l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris par Chabrier et coll. [1957], Cheymol et coll. [1958]. Le TEPP –également synthétisé dans ce laboratoire– et le Para-oxon nous ont servi de substances de référence.

Après la préparation de ces produits, nous avons, dans un premier temps, déterminé *in vitro* l'activité anti-enzymatique de ces dérivés, tant sur les pseudocholinestérases que sur les acétylcholinestérases. Des résultats obtenus (Tableau XXV), on peut conclure que les thionophosphates sont inactifs *in vitro;* seul le 8057 HC possède une faible activité inhibitrice mais, comme nous l'avons mentionné précédemment (page 41), cette activité anticholinestérasique est probablement due aux impuretés et aux traces d'isomères qu'il contient. Par contre, à l'exception du 7901 HC, les thiolophosphates étudiés sont actifs *in vitro* comme inhibiteurs des cholinestérases, mais à un degré très inférieur au Para-oxon et au TEPP: ainsi, le dérivé le plus actif comme inhibiteur des pseudocholinestérases (pseudoChE), le 8062 HC, est 1,250 fois moins actif que le TEPP; il en est de même à l'égard des acétylcholinestérases (AChE), puisque le TEPP possède une activité 68 fois supérieure à celle du dérivé le plus actif, le 8063 HC. Si on classe ces composés en fonction du pouvoir inhibiteur décroissant, on obtient:

pour les pseudoChE: 8062 HC > 8061 HC > 8063 HC > 8014 HC > 7901 HC,

pour les acétylChE: 8063 HC > 8061 HC > 8062 HC > 8014 HC > 7901 HC.

A l'exception du 8063 HC, ces dérivés sont plus actifs sur les pseudo– que sur les acétylcholinestérases.

Dans un second temps, l'étude de la toxicité aigüe a été réalisée chez la Souris –par voie intrapéritonéale–. Ces thiophosphates sont tous beaucoup moins toxiques que le TEPP et le Para-oxon. Le 8061 HC, dérivé le plus actif de la série étudiée, est 58 fois moins toxique que le TEPP. Trois composés, les 7900 HC, 8057 HC et 8059 HC ne sont pratiquement pas toxiques, puisque la DL 50 est à peu près égale ou supérieure à 1,000 mg/kg. La toxicité des thionophosphates est inférieure à celle des thiolophosphates. L'écart entre les DL 50 respectives est ordinairement assez important (Tableau XXV) puisque le 8063 HC, le 7901 HC, le 8062 HC et le 8014 HC sont respectivement 18, 8, 6,4 et 1,7 fois plus toxiques que leur isomère thiono correspondant, les 8059 HC, 7900 HC, 8057 HC et 8014 bis HC. Par contre, la différence entre la DL 50 des isomères 8056 HC et 8061 HC n'est pas significative.

La partie la plus importante de ce travail porte sur l'étude des actions de ces organophosphorés au niveau de la jonction neuromusculaire (Tableau XXV). La préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat a surtout été utilisée, mais, lors

des expériences complémentaires, nous nous sommes également servi du montage nerf – muscle chez le Lapin et chez le Chat.

Après injection intraveineuse chez le Rat, l'action de ces dérivés se manifeste par une potentialisation des contractions musculaires. Elle apparait immédiatement après l'administration des thiolophosphates (sauf dans le cas du 7901 HC qui est presqu'inactif), mais avec un temps de latence de six ou sept minutes pour les thionophosphates, les 8056 HC et 8057 HC (les 7900 HC, 8059 HC et 8014 bis HC sont inactifs). La durée de l'action potentialisatrice des contractions musculaires est également différente: pour les thiolos, les contractions reviennent à leur amplitude normale en 30 ou 40 minutes, alors que pour les thionos, l'amplitude initiale n'est récupérée qu'en deux heures et plus. Ces composés s'accumulent dans l'organisme et on note des effets dûs à la sommation des doses.

Chez le Chat ou le Lapin, après injection intraveineuse, on observe les mêmes phénomènes, mais la durée d'action est beaucoup moins prolongée (inférieure à 20 minutes), tant pour le 8056 HC que pour le 8061 HC. Après injection intra-artérielle proche du muscle chez le Lapin, seuls les thiolophosphates (le 8061 HC) sont actifs; les thionophosphates ne modifient pas l'amplitude des contractions musculaires. Ces résultats sont confirmés *in vitro*: sur la préparation nerf phrénique – diaphragme isolés de Rat, seul le 8061 HC (thiolophosphate) est actif et potentialise les contractions; le 8056 HC (thionophosphate) est inactif.

La *d*-tubocurarine et les thiophosphates actifs sur la préparation neuromusculaire chez le Rat sont des antagonistes réciproques, tant à titre préventif qu'à titre curatif.

Par rapport à la succinyldicholine, ces composés ont, chez le Rat, une action moins nette, puisque tantôt ils antagonisent, tantôt ils augmentent la paralysie musculaire. Cependant, sur le muscle tibial de Chat, le 8061 HC potentialise très nettement la paralysie à la succinyldicholine; sur le soléaire, au contraire , on obtient un antagonisme.

Le méthylsulfate de Pralidoxime est un puissant antagoniste de la potentialisation des contractions musculaires obtenue par les thiophosphates; il ramène rapidement les contractions à leur amplitude initiale. Cependant, des expériences ont montré que ce composé antagonise également la paralysie par la *d*-tubocurarine chez le Rat, elle-même antagoniste des anticholinestérasiques. On peut donc se demander si l'antagonisme du Pralidoxime vis-à-vis de ces produits résulte uniquement de la réactivation des cholinestérases, ou si un autre mécanisme

n'est pas également responsable de l'action antagoniste.

Sur une préparation traitée par une dose active de ces produits, on observe, par stimulation à hautes fréquences, une inhibition dite de haute fréquence ou inhibition de WEDENSKY: alors que le muscle témoin répond à des stimulations de hautes fréquences par un tétanos soutenu, le muscle traité, au contraire, est incapable de soutenir un tétanos, par suite d'un blocage neuromusculaire. L'action des thiolophosphates est instantanée, mais de courte durée; par contre, les thionophosphates manifestent leur action graduellement, mais celle-ci persiste très longgemps. Le Pralidoxime antagonise cette inhibition de WEDENSKY et le muscle récupère presqu'instantanément ses propriétés. L'inhibition de haute fréquence apparait également *in vitro* sur la préparation nerf phrénique – diaphragme de Rat, après traitement par un thiolophosphate.

Lors des expériences complémentaires sur la préparation nerf – muscle, nous avons montré, d'une part, que ces dérivés sont sans action propre sur le muscle, tant chez le Rat que chez le Lapin, d'autre part, que le 8061 HC agit au niveau de la plaque motrice, puisqu'il potentialise la contraction musculaire obtenue par administration d'acétylcholine en injection intra-artérielle proche. Cette localisation d'action est d'ailleurs confirmée par l'action anticurare, par l'action potentialisatrice de la succinyldicholine sur la paralysie musculaire chez le Chat et par l'inhibition de WEDENSKY.

Sur le système nerveux autonome (S.N.A.), nous avons étudié l'action de ces thiophosphates sur les sécrétions, le système cardiovasculaire et sur l'intestin.

Chez le Rat ou le Lapin, pour une dose active sur la préparation neuromusculaire, ces produits entrainent une hypersécrétion salivaire et lacrymale. Chez le Chien, seul le 8061 HC a été étudié: la sécrétion spontanée de la glande sous-maxillaire ne se manifeste que pour une dose de 12 mg/kg, dose quatre fois supérieure à celle qui est nécessaire chez le Rat pour déclencher cette sialorrhée.

Ces composés sont sans action propre sur la pression artérielle de Chien, même à fortes doses –sauf le 7900 HC et le 7901 HC qui sont des hypotenseurs–. Par contre, sur le coeur *in situ*, ils sont doués d'une action chronotrope et inotrope négatives. Ces dérivés potentialisent les effets cardiovasculaires de l'ACh, et cette action potentialisatrice se maintient pendant plusieurs heures, tant pour les thiolos que pour les thionophosphates. Ceux-ci nécessitent cependant une période de latence

d'environ 15 minutes pour produire leur effet maximal. Sur le système cardiovasculaire, le Pralidoxime ne manifeste aucune action antagoniste vis-à-vis de ces dérivés: l'action propre sur le coeur et la potentialisation des effets de l'acétylcholine ne sont pas supprimées.

Chez le Lapin, ces produits sont de faibles hypotenseurs, et cette hypotension ne dure qu'un temps légèrement supérieur à celui de la potentialisation des contractions.

Parallèlement à l'augmentation de l'amplitude des contractions sur la préparation nerf – muscle chez le Rat, ces composés entrainent une très forte hypertension, qui est cependant transitoire, puisque le retour à la pression normale s'effectue en 20 ou 40 minutes. Cette action hypertensive est immédiate avec les thiolophosphates, mais elle n'apparait que six ou sept minutes après l'injection avec les thionophosphates.

Sur l'intestin *in situ* de Chien, ces dérivés augmentent le péristaltisme et le tonus. Avec le 8056 HC, une période de latence de 10 à 15 minutes s'écoule avant le maximum d'action. Pour le 8061 HC et le 8063 HC, une véritable contracture se développe, mais la récupération est assez rapide. Le Pralidoxime ne manifeste aucune action antagoniste sur l'intestin *in situ*.

In vitro, sur l'iléon isolé de Cobaye, seuls les thiolophosphates sont actifs: le 8061 HC augmente le péristaltisme, le tonus et l'action contracturante de l'acétylcholine. Avec des concentrations croissantes de produit, des contractions spontanées d'une grande amplitude apparaissent parallèlement à une véritable contracture, mais ces effets sont complètement réversibles par lavage de la préparation. Le 8056 HC provoque une baisse du tonus et une diminution de l'action contracturante de l'acétylcholine.

Le Pralidoxime ne modifie aucunement les effets du 8061 HC, mais l'atropine et la papavérine antagonisent les effets de ce thiolophosphate, tant à titre préventif qu'à titre curatif.

Dans le Tableau XXV, nous avons réuni quelques résultats obtenus lors de l'étude du pouvoir anticholinestérasique, de la détermination de la dose létale 50 p. 100 chez la Souris et de l'action neuromusculaire des différents dérivés. Pour chacune de ces trois techniques, si on classe de 1 à 10 ces composés par ordre d'activité décroissante et qu'on additionne, pour chaque thiophosphate, les chiffres ainsi obtenus sur les trois séries d'expériences, on trouve, comme activité globale, l'ordre suivant:

8061 HC > 8063 HC > 8062 HC > 8056 HC > 8014 HC > 7901 HC > 8057 HC > 8014 bis HC > 7900 HC > 8059 HC.

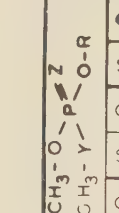
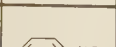
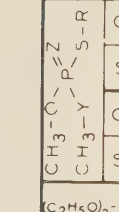
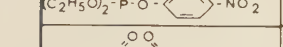
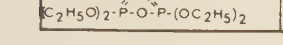
FORMULE Générale	Y	Z	R	NO CONV. H.C	I_{50} IN VITRO PCHE	ACHE	DL 50 i/p mg/kg souris	DOSE MIN. POTENT. MAX. mg/kg	latence minutes	durée minutes
	O	S	$-CH_3$	7900	>1000	>1000	1070	INACTIF		
	S	O		7901	>1000	>1000	135	250	50	>120
	O	S		8056	>1000	>1000	72	4	6	>120
	S	O		8061	2,2	2,7	70	3	1	35
	O	S		8057	31	190	960	30	7	>120
	S	O		8062	1	6	150	20	1	35
	O	S	$-CH(COOEt)-CH_2-COOEt$	8059	>1000	>1000	1280	INACTIF		
	S	O		8063	22,5	1,7	71	5	1	35
	O	S	$-CH_2-CO-NH-CH_3$	8014 bis	>1000	>1000	191	INACTIF		
	S	O		8014	80	140	114	35	2	60
				PARAOXON	0,006	0,065	2,73	0,40	1	>120
				TEPP	0,0008	0,025	1,20	0,16	1	>120

Tableau XXV: *Comparaisons entre structure chimique, inhibition 50 p. 100* in vitro *sur les pseudocholinestérases (PChE) et sur les acétylcholinestérases (AChE), dose létale 50 p. 100 chez la Souris, dose minimale potentialisatrice maximale sur la préparation nerf sciatique – muscle tibial antérieur de Rat et caractéristiques (latence et durée) de cette potentialisation .*

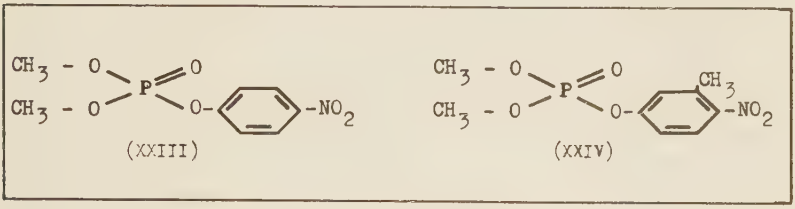
A l'exception du 8056 HC qui s'intercalle entre deux thiolophosphates, le groupe des thionophosphates est moins actif que le groupe des thiolos. On peut d'ailleurs vérifier sur ce Tableau XXV que chaque thiolo est toujours plus actif que le thiono correspondant. Ces différences résultent de ce que les thionos sont inactifs comme inhibiteur des cholinestérases *in vitro*. Comparons, par exemple, les deux isomères les plus actifs, les 8056 HC et 8061 HC (Tableau XXVI). On constate que le 8056 HC est inactif *in vitro*, mais qu'*in vivo*, à dose sensiblement égale à celle du thiolo, il possède une activité comparable à celle de son isomère, le 8061 HC. Si on revient au Tableau XXV et qu'on recherche, sur la préparation neuromusculaire, les variantes de la potentialisation par les thiolos ou les thionos, on en déduit que seuls le temps de latence et la durée d'action sont différents. Or, ces deux caractéristiques se retrouvent constamment avec toutes les techniques *in vivo:* préparation nerf – mus-

	8061 H.C. thiolophosphate	8056 H.C. thionophosphate
Inhibition 50 p.100 "in vitro"		
µg/5 ml pseudocholinestérases:	2,2	> 1000
µg/5 ml acétylcholinestérases:	2,7	> 1000
Dose létale 50 p.100 en mg/kg voie intrapéritonéale (Souris)	70	72
Préparation neuromusculaire: dose minimale potentialisatrice maximale		
-"in situ" chez le Rat voie intraveineuse (mg/kg)	3	4
-"in situ" chez le Lapin voie intraveineuse (mg/kg)	5	5
-"in situ" chez le Lapin voie intra-artérielle (µg)	30	inactif
-"in vitro" µg/ml diaphragme isolé de Rat	0,1	inactif
Système cardiovasculaire: (Chien) dose active (mg/kg)	1,5	2
Intestin -"in situ" (Chien): dose active (mg/kg)	1,5	2
-"in vitro": iléon de Cobaye dose active: µg/ml	0,2 - 0,4	inactif

Tableau XXVI: *Comparaison des actions de deux isomères, les 8056 HC et 8061 HC, sur différentes préparations* in situ *et* in vitro.

cle chez le Rat et le Lapin, pression artérielle chez le Rat, le Lapin et le Chien, coeur et intestin *in situ* de Chien. Les thionophosphates subissent très certainement une transformation métabolique *in vivo*; plusieurs auteurs ont montré (voir page 17) que cette activation consiste en une réaction d'oxydation. Ces deux dérivés agissent donc par un métabolite qui est probablement, pour le 8056 HC, le Méthylpara-oxon (Formule XXIII) et, pour le 8057 HC, le Sumi-oxon (Formule XXIV). Cette activation métabolique est confirmée par le fait que le 8056 HC, injecté par voie intraveineuse chez le Lapin, est actif alors qu'après

administration par voie intra-artérielle proche du muscle, il est inactif. Il en résulte que cette transformation métabolique ne se fait certainement pas au niveau du muscle. Ces deux métabolites "oxon" ont une activité supérieure à celle du thiolophosphate correspondant, puisque la durée d'action est beaucoup plus prolongée, signe d'une stabilité beaucoup plus grande du complexe enzyme – inhibiteur. Les dithiophosphates à configuration thiono (8059 HC et 8014 bis HC) sont inactifs même *in vivo* et à fortes concentrations: l'organisme possède donc très certainement des systèmes enzymatiques capables d'hydrolyser rapidement ces composés en métabolites inactifs (voir page 18).



Dans ce travail, nous n'avons fait qu'effleurer quelques actions de ces dérivés à différents niveaux de l'organisme. Cependant, comme le soulignent MIKELSON [1957] et RASUMOV [1957], une connaissance plus approfondie des organophosphorés à propriétés anticholinestérasiques peut permettre, dans un avenir plus ou moins rapproché, de multiples possibilités d'utilisation de ces composés en thérapeutique humaine. Selon ces auteurs, les grandes voies dans lesquelles ces recherches doivent être engagées sont les suivantes:

– en ophtalmologie, dans le glaucome,

– en psychiatrie, pour la stimulation de l'activité nerveuse des malades: exploration de l'activité cérébrale et analyse des différentes fonctions du système nerveux,

– dans l'atonie ou la parésie intestinale,

– dans la myasthénie,

– en obstétrique, comme substance ocytocique,

– dans le traitement de la tuberculose et du cancer: certains organophosphorés ont une action sélective sur les aliestérases.

Cependant, avant d'en arriver à une utilisation aussi courante de ce groupe de composés, les recherches devront être poursuivies et intensifiées, de telle sorte qu'on puisse découvrir de nombreux composés actifs, peu toxiques pour l'Homme.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ADMIRAAL, J., D.K. MYERS et J.C. VAN HOUTEN.— Effect of inhibition of cholinesterase on the motility of the small intestine. *Nature (Lond.)* : 1955, **176**, 468-469.

ALDRIDGE, W.N.— Some observations on the characteristics of serum esterases with special reference to the hydrolysis of diéthyl p-nitrophenyl phosphate. *Ph.D. Thesis, London University*, 1951.

ALDRIDGE, W.N.— The inhibition of erythrocyte cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.:* 1953a, **53**, 62-67.

ALDRIDGE, W.N.— Serum esterases. I.Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl propionate, butyrate and a method for their determination. II.An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate and its identity with the A esterase of mammalian sera. *Biochem. J.:* 1953b, **53**, 110-124.

AMMON, R.— Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflügers Arch. ges. Physiol.:* 1933, **233**, 486-491.

ANDERSSON-CEDERGREN, E.— Ultrastructure of motor end-plate and sarcoplasmic components of mouse skelettal muscle fiber. *J. Ultrastruct. Res.:* 1959, suppl. **1**, 1-191.

ARBUZOW, A.E. et B.A. ARBUZOW.— Über die Ester der Pyrophosphorigen, der Unterphosphor— und der Pyrophosphorsaüre. *J. Prakt. Chem.:* 1931, **238**, 103-132.

ASKEW, B.M.— Oximes and hydroxamic acids as antidotes in anticholinesterase poisonning. *Brit. J. Pharmacol.:* 1956, **11**, 417-423.

AUGUSTINSSON, K.B.— Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. *Biochim. Biophys. Acta:* 1954, **13**, 303-304.

AUGUSTINSSON, K.B.— Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. *Acta Chem. Scand.:* 1954, **8**, 753-767, 915-920, 1533-1541. **11**, 1371-1377.

AUGUSTINSSON, K.B. et G. HEIMBURGER.— Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. *Acta Chem. Scand.:* 1955, **9**, 310-318.

AUGUSTINSSON, K.B. et D. NACHMANSOHN.— Studies on cholinesterase. Kinetics of the inhibition of acetylcholine esterase. *J. Biol. Chem.:* 1949, **179**, 543-559.

BARNES, J.M. et J.I. DUFF.— The role of cholinesterase at the myoneural junction. *Brit. J. Pharmacol.:* 1953, **8**, 334-339.

BARSTAD, J.A.B.— The effect of *d*-tubocurarine on the neuromuscular block caused by DFP and acetylcholine. *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1956a, **107**, 4-20.

BARSTAD, J.A.B.— The effect of DFP on the neuromuscular transmission and the importance of cholinesterase for the transmission of single impulses. *Arch. Intern. Pharmacodyn .:* 1956b, **107**, 21-32.

BARSTAD, J.A.B.— Cholinesterase inhibition and the effect of anticholinesterases on indirectly evoked single and tetanic muscle contractions in the phrenic—nerve—diaphragm preparation from the rat. *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1960, **128**, 143-168.

BEHRENS, B. et G. KARBER.— Wie Sind Reihenversuche fur biologische Auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen? *Arch Exptl. Pathol. Pharmakol:* 1935, **177**, 379-388.

BERNHARD, S.A.— Symposium on enzyme reaction mechanisms. Gathinburg, Tenn. 1-4 April 1959. *J. Cellular Comp. Physiol.:* 1959, **54**, 188-199.

BERRY, W.K. et C.L. EVANS.— Cholinesterase and neuromuscular block. *J. Physiol. (Lond.):* 1951, **115**, 46P-47P.

BERRY, J.F. et V.P. WHITTAKER.— The acyl-group specificity of choline acetylase. *Biochem. J.:* 1959, **73**, 447-458.

BETHE, K., W.D. ERDMANN, L. LENDLE et G. SCHMIDT.— Spezifische Antidot — Behandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (paraoxon, parathion, DFP) und eserin an Meerschweinchen. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.:* 1957, **231**, 3-22.

BEZNAK, A.V.— Die autocoïde Aktivität des venösen Blutes von sezernieren den Submaxillardrüsen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.:* 1932, **229**, 719-729.

BOURDELLE J. et C. BRESSOU.— Anatomie régionale des animaux domestiques. IV Carnivores: Chien et Chat. *Baillère Edit., Paris:* 1953, 502 pages.

BOURILLET, F.— Antagonisme et potentialisation de la curarisation par quelques molécules soufrées. *Thèse Doct. Pharmacie (Etat). Legrand Edit., Paris:* 1959, 300 pages.

BRISCOE, S. et J.H. BURN.— Quinidine and anticholinesterases on rabbit auricles. *Brit. J. Pharmacol.:* 1954, **9**, 42-48.

BROOKS, V.B.— The action of botulinum toxin on motor-nerve filaments. *J. Physiol. (Lond.):* 1954, **123**, 501-515.

BROWN, G.L.— Transmission at nerve endings by acetylcholine. *Physiol. Rev.:* 1937, **17**, 485-513.

BROWN, G.L., H.H. DALE et W. FELDBERG.— Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and eserine. *J. Physiol. (Lond.):* 1936, **87**, 394-424.

BROWN, G.L. et W. FELDBERG.— The action of diisopropylfluorophosphate on neuromuscular transmission. *J. Physiol. (Lond.):* 1947, **106**, 36P.

BROWN, L.M.— A thiocholine method for locating cholinesterase activity by electron microscopy. Histochemistry of cholinesterase, Symposium, Basel, 1960. *Bibliotheca Anat.:* 1961, **2**, 21-33.

BÜLBRING, E.— Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Brit. J. Pharmacol.:* 1946, **1**, 38-61.

BÜLBRING, E. et J.H. BURN.— Action of acetylcholine on rabbit auricle in relation to acetylcholine synthesis. *J. Physiol. (Lond.):* 1949, **108**, 508-524.

BURGEN, A.S.V.— The assay of anticholinesterase drugs by the chromodacryorrhoea response in rats. *Brit. J. Pharmacol.:* 1949a, **4**, 185-189.

BURGEN, A.S.V.— The mechanism of action of anticholinesterase drugs. *Brit. J. Pharmacol.:* 1949b, **4**, 219-228.

BURGEN, A.S.V. et F. HOBBIGER.– The inhibition of cholinesterases by alkylphosphates and alkylphenolphosphates. *Brit. J. Pharmacol.:* 1951, **6**, 593-605.

BURGEN, A.S.V., C.A. KEELE et D. SLOME.– Pharmacological actions of tetraethylpyrophosphate et hexaethyltetraphosphate. *J. Pharmacol. Exp'l. Therap.: 1949*, **96**, *396-409.*

BURN, J.H., P. KORDEK et R.H. MOLE.– The effect of X-ray irradiation on the response of the intestine to acetylcholine and on its content of "pseudo"–cholinesterase. *Brit. J. Pharmacol.:* 1952, **7**, 58-66.

BURN, J.H. et S.R. KOTTEGODA.– Action of eserine on the auricles of the rabbit heart. *J. Physiol. (Lond.):* 1953, **121**, 360-373.

BURN, J.H. et J.M. WALKER.– Anticholinesterases in the heart-lung preparation. *J. Physiol. (Lond.):* 1954, **124**, 489-501.

CHABRIER, P.– Récents travaux de l'Institut de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Paris sur les composés organophosphorés. *Actualités Pharmacol.:* 1963, **16**, 7-33.

CHABRIER, P. et M. SELIM.– Nouvelle méthode de préparation des diesters de l'acide orthophosphorique. *Compt. Rend. Acad. Sci.:* 1957, **244**, 2730-2732.

CHEYMOL, G.– Contribution à l'étude de quelques dérivés tétrasubstitués de l'acide hypophosphorique. *Thèse Doct. Méd., Paris,* 1962, 82 pages.

CHEYMOL, J.– Des anticholinestérasiques. *Acta Inst. Anesth.:* 1962, **11**, 23-50.

CHEYMOL, J., J.R. BOISSIER et R. LECHAT.– Principes de l'étude de la toxicité d'un médicament nouveau. *Thérapie:* 1961, **16**, 326-340.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, M. ADOLPHE et F. HEITZ.– Recherches sur le pouvoir radioprotecteur de quelques organophosphorés. *Bull. Acad. Natl. Méd. (Paris):* 1963a, **147**, 673-678.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, M. BEAUVALLET, M. SELIM et N. THUONG.– Contribution à l'étude chimique et pharmacologique des dérivés de l'acide orthophosphorique. V.– Constitution chimique et activité anticholinestérasique de quelques phosphoramides. *Thérapie:* 1961, **16**, 28-33.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER et A. CARAYON–GENTIL.– Propriétés pharmacodynamiques des dérivés de synthèse de l'acide orthophosphorique. *Biol. Méd. (Paris):* 1963b, **52**, 527-570.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER ET G. CHEYMOL.– Etude pharmacologique de dérivés méthylés ou éthylés tétrasubstitués de l'acide hypophosphorique *Thérapie:* 1964a, **19**, 227-246.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER et M. MURAD.– Contribution à l'étude chimique et pharmacologique des dérivés de l'acide orthophosphorique. IV.– Etude pharmacologique de deux triesters homologues: phosphate de diméthylpropargyl et phosphate de diéthylpropargyl. *Thérapie:* 1960a, **15**, 242-246.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, M. MURAD et M. SELIM.— Contribution à l'étude chimique et pharmacologique des dérivés de l'acide orthophosphorique. III.— Constitution chimique et activité cholinestérasique. *Thérapie:* 1960b, **15**, 237-241.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER et G. OLIVE.— Action neuromusculaire de quelques esters d'ortho—, de pyro— et d'hypophosphoramides. *Thérapie:* 1964b, **5**, 1423-1439.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, M. SELIM et P. LEDUC.— Nouvelle méthode de préparation des diesters mixtes de l'acide orthophosphorique. *Compt. Rend. Acad. Sci.:* 1958, **247**, 1014.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, M. SELIM et P. LEDUC.— Nouvelle méthode de préparation des triesters mixtes de l'acide orthophosphorique. *Compt. Rend. Acad. Sci.:* 1959, **249**, 2573-2575.

CHEYMOL, J., P. CHABRIER, N. THUONG et J.P. TILLEMENT.— Constitution chimique et activité anticholinestérasique de dérivés trisubstitués alcoylés, aralcoylés et acylés des acides phosphorique, phosphonique, thiophosphorique et sélénophosphorique. *Compt. Rend. Soc. Biol.:* 1964c, **158**, 24-26.

CHEYMOL, J., M. SABOURDY, R. PORTET, M. BEAUVALLET et H. TUFFRAU.— Toxicité comparée de la strychnine et de la procaïne sur diverses souches de Souris. Etude statistique. *Biol. Méd. (Paris):* 1964d, **53**, 169-201.

CHOISY, H.— Contribution à l'étude pharmacologique de quatre esters phosphoriques du paranitrophényle. *Thèse Doct. Méd., Paris,* 1962, 138 pages.

COHEN, J.A., R.A. OOSTERBAAN, H.S. JANSZ et F. BERENDS.— The active site of esterases. *J. Cellular Comp. Physiol.:* 1959, **54**, 231-244.

COHEN, J.A., et C.H. POSTHUMUS.— The mechanism of action of anticholinesterases. *Acta Physiol. Pharmacol. Néerl.:* 1955a, **4**, 17-36

COHEN, J.A. P.J. WARRINGA et L. INDORF.— Relationship between the pharmacological action of neuromuscular drugs and their capacity to inhibit esterases. *Acta Physiol. Pharmacol. Néerl.:* 1955b, **4**, 187-200.

COUTEAUX, R.— Les structures synaptiques: revue des données récentes et leur incidence sur la théorie du neurone. *Compt. Rend. Soc. Biol.:* 1953, **147**, 1332-1338.

COUTEAUX, R.— Morphological and cytochemical observations on the post-synaptic membrane at motor end-plates and ganglionic synapses. *Exptl. Cell. Res.:* 1958, suppl. **5**, 294-322.

COUTEAUX, R. et J. TAXI.— Recherches histochimiques sur la distribution des activités cholinestérasiques au niveau de la synapse myoneurale. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl.:* 1952, **41**, 352-392.

CULLUMBINE, H. et P. DIRNHUBER.— Oral and bronchial fluids in poisoning with anticholinesterases. *J. Pharm. Pharmacol.:* 1955, **7**, 580-585.

DALE, H.H.— Pharmacology and nerve endings. *Proc. Roy. Soc. Méd.:* 1934, **28**, 319-322

DALE, H.H et W. FELDBERG.– Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle. *J. Physiol. (Lond.):* 1934, **81**, 39P-40P.

DALE, H.H. et M. VOGT.– Release of acetylcholine at voluntary motor nerve-endings. *J .Physiol. (Lond.):* 1936, **86**, 353-380.

DAVISON, A.N.– The conversion of O.M.P.A. and Parathion into inhibitors of cholinesterase by mammalian livers. *Biochem. J.:* 1955, **61**, 203-209.

DEBURGH, DALY M. et P.G. WRIGHT.– The effects of anticholinesterases upon peripheral vascular resistance in the dog. *J. Physiol. (Lond.):* 1956, **133**, 475-497.

DECHEZLEPRETRE, S.D.– Contribution à l'étude de l'action amylasique de la salive: digestion salivaire des produits de panification *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme. Activité de la salive chez quelques mammifères et dans certains cas pathologiques chez l'Homme. *Thèse Doct. Sci., Dijon,* 1965.

DEGRELLE, H. et J.P. TILLEMENT.– Les cholinestérases. Détermination d'activité. *Ann. Pharm. Franc.:* 1964a, **22**, 505-509.

DEGRELLE, H. et J.P. TILLEMENT.– Contribution à l'étude de l'activité anticholinestérasique des organophosphorés *in vitro*. *Ann. Pharm. Franc.:* 1964b, **22**, 511-515.

DENZ, F.A.– On the histochemistry of the myoneural junction. *Brit. J. Exptl. Pathol.:* 1953, **34**, 329-339.

DEYSSON, G., J. CHEYMOL, C. BOURNIQUE et P. CHABRIER.– Recherches sur la cytotoxicité des combinaisons organiques des acides dérivés du phosphore. I.– Comparaison de l'activité des dérivés triméthylés des acides thio– et séléno–orthophosphoriques sur la cellule végétale (test Pisum) et sur la cellule cancéreuse humaine cultivée *in vitro* (test Héla). *Thérapie:* 1964, **19**, 1509-1522-

DIGGLE, W.M. et J.C. GAGE.– Cholinesterase inhibition *in vitro* by Parathion. *Biochem. J.:* 1951, **49**, 491-494.

DIRNHUBER, P. et H. CULLUMBINE.– The effect of anticholinesterase agents on the rat blood pressure. *Brit. J. Pharmacol.:* 1955, **10**, 12-15.

DIRNHUBER, P et C. LOVATT EVANS.– The effect of anticholinesterases on humoral transmission in the submaxillary gland. *Brit. J. Pharmacol.:* 1954, **9**, 441-458.

DISCUSSION on poisonning with anticholinesterases. *Proc. Roy. Soc. Med.:* 1953, **46**, 799-804.

EINSEL, D.W. JR., H.J. TRURNIT, S.D. SILVER et E.C. STEINER.– Self-equilibrating electrolytic method for determination of acid production rates. *Anal. Chem.:* 1956, **28**, 408-410.

ENGELHART, E. et O. LOEWI.– Fermentative Acetylcholinspaltung im Blut und ihre Hemmung durch Physostigmin. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.:* 1930, **150**, 1-13.

ERDMANN, W.D. et D. HEYE.— Analyse der erregenden und lahmenden Wirkung von Alkylphosphaten (Parathion, Paraoxon, Systox) am isolierten Kaninchendarm. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.:* 1958, **232**, 507-521.

ERDMANN, W.D. et L. LENDLE.— Vergiftungen mit esteraseblockierenden Insecticiden aus der Gruppe der organischen Phosphorsäure—Ester (E605 und Verwandte). *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilk.:* 1958, **10**, 104-184.

FELDBERG, W.— Synthesis of acetylcholine. In: R.W. Gerard Ed., Methods in Medical Research, vol. 3, 95-106. *Chicago: Year Book Publishers* 1950.

FELDBERG, W. et R.C.Y. LIN.— Acetylcholine release and synthesis in the wall of the small intestine. *J. Physiol. (Lond.):* 1949, 109, 32P.

FELDBERG, W. et M. VOGT.— Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. *J. Physiol. (Lond.):* 1948, **107**, 372-381.

FUKUTO, T.R.— The chemistry and action of organic phosphorus insecticides. In: R.L. Metcalf Ed., Advances in Pest control Research, vol. 1, 147-192. *New York: Interscience Publishers Inc. 1957.*

GAGE, J.C.— A cholinesterase inhibitor derived from parathion *in vivo*. *Biochem. J.:* 1953, **54**, 426-430.

GARDINER, J.E. et V.P. WHITTAKER.— The identification of propionylcholine as a constituent of ox spleen. *Biochem. J.:* 1954, **58**, 24-29.

GAUTRELET, J.— Eléments de technique physiologique. *Masson Edit.* 1932.

GIACOBINI, E. et B. HOLMSTEDT.— Cholinesterases in muscles: a histochemical and microgasometric study. *Acta Pharmacol. Toxicol.:* 1960, **17**, 94-105.

HARNACK, E. et L. WITKOWSKI.— Pharmakologische Untersuchungen über das Physostigmin und Calabarin. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.:* 1876, **5**, 401-454.

HAZARD, R. et J. DELGA.— Action de la dihydro-oxycodéinone sur la cholinestérase du sang et du cerveau chez le Cobaye normal ou intoxiqué au DFP. *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1952, **90**, 116-122.

HAZARD, R., A. CORNEC et P. PIGNARD.— La dihydro-oxycodéinone activateur de la procaïnestérase; pseudocholinestérase et dihydro-oxycodéinone. *Compt. Rend. Soc. Biol.:* 1950, **144**, 358-360.

HEATHCOTE, R. ST.A.— The action of physostigmine with special reference to the circulatory system and the intestine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1932, **44**, 95-108.

HEBB, C.O. et G.M. WAITES.— Choline acetylase in antero and retrograde degeneration of a cholinergic neuron. *J. Physiol. (Lond.):* 1956, **132**, 667-671.

HEIDENHAIN, R.– Uber die Wirkung einiger Gifte auf die Nerven der glandula submaxillaris. *Pflügers Arch. ges. Physiol.:* 1872, **5**, 309-318.

HESTRIN, S.– The reaction of acetylcholine and carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.:* 1949, **180**, 249-261.

HEYMANS, C.– Les antidotes du di-isopropylfluorophosphate (DFP). *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1950, **81**, 230-234.

HEYMANS, C.– Les substances anticholinestérasiques. *Exposés Ann. Biochem. Med.:* 1951, **12**, 21-53.

HEYMANS, C., A. POCHET et H. VAN HOUTTE.– Contributions à la pharmacologie du Sarin et du Tabun. *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1956, **104**, 293-332.

HOLMES, R.L.– Cholinesterase activity in atrial wall of dog and cat heart. *J. Physiol. (Lond.):* 1957, **137**, 421-426.

HOLMES, R. et E.L. ROBINS.– The reversal by oximes of neuromuscular block produced by anticholinesterases. *Brit. J. Pharmacol.:* 1955, **10**, 490-495.

HOLMSTEDT, B.– Synthesis and pharmacology of dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun) together with a description of some allied anticholinesterase compounds containing N–P bond. *Acta Physiol. Scand.:* 1951, **25**,(suppl. 90), 1-20.

HOLMSTEDT, B.– Organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Rev.:* 1959, **11**, 567-688.

HUNT, C.C.– The effect of di-isopropylfluorophosphate on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1947, **91**, 77-83

HUXLEY, H.E. et J. HANSON.– The molecular basis of contraction in cross striated muscles. In: G.H. Bourne Ed., Structure and function of muscle, vol. 1, 183-228. *New York: Academic Press* 1960.

IL'YUCHENOK, T.YU.– Effect of organophosphorus compounds on salivation and intestinal secretion. *Akad. Nauk. SSSR.:* 1955, 318-323.

KAYSER, C.– Physiologie. Système nerveux et muscle. *Flammarion Edit.,* 1963.

KOELLE, G.B.– The histochemical differenciation of types of cholinesterases and their localizations in tissues of the cat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1950, **100**, 158-179.

KOELLE, G.B.– Cholinesterases of the tissus and sera of rabbits. *Biochem. J.:* 1953, **53**, 217-226.

KOELLE, G.B.– Histochemical demonstration of reversible anticholinesterase action at selective cellular sites *in vivo*. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1957, **120**, 488-503.

KOELLE, G.B.– A proposed dual neurohumoral role of acetylcholine: its functions at the pre– and post–synaptic sites. *Nature (Lond.):* 1961, **190**, 208-211.

KOELLE, G.B.– A new general concept of the neurohumoral functions of acetylcholine and acetylcholinesterase. *J. Pharm. Pharmacol.:* 1962, **14**, 65-90.

KOELLE, G.B.– Cholinesterases and anticholinesterase agents. *Handbuch Exptl. Pharmakol.:* 1963, **15**, (Springer–Verlag Ed.).

KOELLE, G.B., E.S. KOELLE et J.S. FRIEDENWALD.– The effect of inhibition of specific and non specific cholinesterase on the motility of the isolated ileum. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1950, **100**, 180-191.

KOELLE, W.A. et G.B. KOELLE.– The localization of external or functional acetylcholinesterase at the synapses of autonomic ganglia. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1959, **126**, 1-8.

KOREY, S.R., B. DE BRAGANZA et D. NACHMANSOHN.– Choline acetylase. V.– Esterifications and transacetylations. *J. Biol. Chem.:* 1951, **189**, 705-715.

KROPP, S. et A.M. KUNKEL.– Observations on the pharmacology of the anticholinesterases sarin and tabun. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.:* 1954, **86**, 530-533.

LANGLEY, J.N.– On the reactions of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards to the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J. Physiol. (Lond.) :* 1905, **33**, 374-413.

LEHRER, G.M. et L.A. ORNSTEIN.– A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.:* 1959, **6**, 390-406.

LÉVY, J.– Les cholinestérases. *J. Physiol. (Paris):* 1947, **39**, 413.

LITCHFIELD JR, J.T. et F. WILCOXON.– A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1949, **96**, 99-113.

MACINTOSH, F.C.– Choline-esterase content of normal and denervated submaxillary gland of the Cat. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.:* 1937, **37**, 248-251.

MAGNUS. R.– Versuche am überlebenden Dünndarm von Saügethieren. *Pflügers Arch. ges. Physiol.:* 1904, **102**, 123-151.

MARNAY, A. et D. NACHMANSOHN.– Choline esterase in voluntary muscle. *J. Physiol. (Lond.):* 1938, **92**, 37-47.

MAZUR, A.– An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkylfluorophosphates. *J. Biol. Chem.:* 1946, **164**, 271-289.

MCNAMARA, B.P., E.F. MURTHA, A.D. BERGNER, E.M. ROBINSON, C.W. BENDER ET J.H. WILLS.– Studies on the mechanism of action of DFP and TEPP. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1954, **110**, 232-240.

METCALF, R.L. et R.B. MARCH.– Further studies on the mode of action of organic thionophosphate insecticides. *Ann. Entomol. Soc. Am.:* 1953a, **46**, 63-74.

METCALF, R.L. et R.B. MARCH.– Reversed-phase paper chromatography of Parathion and related phosphate esters. *Science:* 1953a, **117**, 527-528.

MICHEL, H.— An electrometric method for the determination of red blood cells and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.:* 1949, **34**, 1564-1568.

MIKHEL'SON, M. YA.— Khim i primenenie fosfororganitsheskikh Soedineii. *Akad. Nauk. SSSR.:* 1957, 285-300.

MIQUEL, O.— The action of physostigmine, di-isopropylfluorophosphate and other parasympathomimetic drugs on the rectus muscle of the frog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1946, **88**, 67-71.

MOUNTER, L.A.— Some studies of enzymatic effects of rabbit serum. *J. Biol. Chem.:* 1954, **209**, 213-217.

MOUNTER, L.A., H.C. ALEXANDER, K.D. TUCK et L.T. H. DIEN.— The pH dependance and dissociation constants of esterases and protease treated with DFP. *J. Biol. Chem.:* 1957, **226**, 867-872.

MURPHY, S.D. et K.P. DUBOIS.— Quantitative measurements of inhibition of the enzymatic detoxication of Malathion by E.P.N. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.:* 1957, **96**, 813-818.

MYERS, D.K., B. MENDEL, H.R. GERSMANN et J.A.A. KETELAAR.— Oxidation of thiophosphate insecticides in rats. *Nature (Lond.):* 1953, **170**, 805-807.

NACHMANSOHN, D., E.A. FELD et M.A. ROTHENBERG.— Studies on cholinesterase. Kinetics of enzyme inhibition. *J. Biol. Chem.:* 1948, **174**, 247-256.

NACHMANSOHN D. et A.L. MACHADO.— The formation of ACh. *J. Neurophysiol.:* 1943, **6**, 397-404.

NACHMANSOHN, D. et I.B. WILSON.— In: Electrochimistry in biology and medecine. *New York: John Wiley and Son* 1954.

NACHMANSOHN, D., I.B. WILSON, S.R. KOREY et R. BERMAN.— Choline acetylase. VI.— Substitution of ATP-acetate by thiolacetate. *J. Biol. Chem.:* 1952, **195**, 25-36.

NEGHERBON, W.O.— Insecticides. In: National Academy of Science Ed., Handbook of Toxicology, vol. 3, 854 pages. *Philadelphia: W.B. Saunders Co.,* 1959.

OLIVE, G.— Action neuromusculaire de quelques esters d'ortho, de pyro et d'hypophosphoramides. *Thèse Doct. Méd., Paris,* 1963, 89 pages.

ORD, M.G. ET R.H.S. THOMPSON.— The distribution of cholinesterase types in mammalian tissues. *Biochem. J.:* 1950, **46**, 346-352.

PAL, J.— Physostigmin, ein Gegengift des Curare. *Zentralblatt für Physiol.:* 1900, **14**, 255-258.

PAULET, G.— Nouvelle contribution à l'étude de l'action pharmacologique du tétraéthylpyrophosphate (TEPP). *Arch. Intern. Pharmacodyn.:* 1954, **97**, 157-185.

RAMUSOV, A.I.— Biological activity and practical application of organic compounds of phosphorus. *Usp. Khim.:* 1957, **26**, 975-991.

RASUMOV, A.I., E.A. MARKOVITCH et O.A. MUKHATCHEVA.— Khim i primenenie fosfororganitsheskikh Soedineii. *Akad. Nauk. SSSR.:* 1957, 194-204.

RIKER JR., W.F.— Excitatory and anti-curare properties of acetylcholine and related quaternary ammonium compounds at the neuromuscular junction. *Pharmacol. Rev.:* 1953, **5**, 1-86.

RIKER JR., W.F.— The relationship between cholinesterase inhibition and fuction in a neuroeffector system. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1949, **95**, 515-527.

ROBERTSON, J.D.— The ultrastructure of a reptilian myoneural junction. *J. Biophys. Biochem. Cytol.:* 1956, **2**, 381-394.

RYDON, H.N.— A possible mechanism of action of esterases inhibition by organophosphorus compounds. *Nature (Lond.):* 1958, **182**, 928.

SCHWARZACHER, H.G.— Der histochemisch nach weisbare Cholinesterasegehalt in Muskelplatten nach Durchschneidung des motorischen Nerven. *Acta Anat.:* 1957, **31**, 507-521.

SHELLEY, H.— A correlation between cholinesterase inhibition and increase in muscle tone in rabbit duodenum. *Brit. J. Pharmacol.:* 1955, **10**, 26-35.

STEDMAN, E. et A.C. WHITE.— A comparaison of the choline-esterase activities of the blood-sera from various species. *Biochem. J.:* 1933, **27**, 1055-1060.

TAMMELIN, L.E.— An electrometric method for the determination of cholinesterase activity. I.— Apparatus and cholinesterase in human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.:* 1953, **5**, 267-270.

TAMMELIN, L.E.— Organophosphorylcholines and cholinesterases. *Arkiv. Kemi.:* 1958, **12**, 287-298.

TAMMELIN, L.E. et B. STRINDBERG.— Cholinesterase activity determined with an electrometric method. *Acta Chem. Scand.:* 1952, **6**, 1041-1047.

THESLEFF, S.— Structure and function of muscle. In: Effects of drugs on smooth and striated muscle. *New York: Academic Press,* 1960.

TILLEMENT, J.P. et H. DEGRELLE.— Appréciation de l'activité cholinestérasique du sang de Lapin (hématies et plasma). *Thérapie:* 1964, **19**, 725-731.

VAN DER MEER, C.— The mecanism of action of anticholinesterases. The effect of DFP on the isolated rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Physiol. Pharmacol. Néerl.:* 1956, **4**, 454-471.

VARAGIC, V.— The action of eserine on the blood pressure of the rat. *Brit. J. Pharmacol.:* 1955, **10**, 349-353.

VOLLE, R.L. et G.B. KOELLE.— The physiological role of acetylcholinesterase in sympathetic ganglia. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.:* 1961, **133**, 223-240.

WILSON, I.B.— Acetylcholinesterase. XIII.— Reactivation of alkyl-phosphate-inhibited enzyme. *J. Biol. Chem.:* 1952, **199**, 113-120.

WILSON, I.B.— Promotion of acetylcholinesterase activity by the anionic site. In: The physical chemistry of enzyme. *Disc. Faraday Soc.:* 1955, **20**, 119-125.

WILSON, I.B.— Molecular complementarity and antidotes for alkyl-phosphate poisonning. *Federation Proc.:* 1959, **18**, 752-758.

WILSON, I.B.— Inhibition of acetylcholinesterase. In: Metabolic Inhibitors, vol. 2, 193-204. *New York: Academic Press, 1963.*

WILSON, I.B. et F. BERGMANN.— Studies on cholinesterase. VII.— The active surface of acetylcholine esterase derived from effects of pH on inhibitors. *J. Biol. Chem.:* 1950a, **185**, 479-489.

WILSON, I.B., F. BERGMANN et D. NACHMANSOHN.— Acetylcholinesterase. X.— Mechanism of the catalysis of acylation reactions. *J. Biol. Chem.:* 1950b, **186**, 781-790.

WILSON, I.B. et S. GINSBURG.— A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta:* 1955, **18**, 168-170.

ZAIMIS, E.— Motor end-plates differences as a determining factor in the mode of action of neuromuscular blocking substances. *Nature (Lond.):* 1952, **170**, 617.

ZAIMIS, E.— Motor end-plates differences as a determining factor in the mode of action of neuromuscular blocking substances. *J. Physiol. (Lond.):* 1953, **122**, 238-251.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 3

GÉNÉRALITÉS

I– Historique 5
II– Mécanismes cholinergiques et anticholinergiques 7
A– L'acétylcholine 8
B– Les cholinestérases 10
C– Les anticholinestérasiques 13
D– Réactivation des cholinestérases bloquées par les organophosphorés 19

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

CHIMIE 24
A– Préparation 25
B– Propriétés physico-chimiques 30
C– Conservation, mise en solution 31
D– Substances de référence 32

PHARMACOLOGIE

Première Partie: Détermination du pouvoir anticholinestérasique 35
A– Méthodes de détermination de l'activité des cholinestérases 36
B– Détermination du pouvoir anticholinestérasique *in vitro* par la méthode de MICHEL 37
C– Détermination du pouvoir anticholinestérasique *in vivo* par la méthode de MICHEL 43

Deuxième Partie: Essais de toxicité. 45
A– Généralités 46
B– Protocole expérimental 49
C– Résultats expérimentaux 50
D– Essai d'interprétation des résultats. Relations structure-toxicité 52
E– Relations entre toxicité et pouvoir anticholinestérasique *in vitro* 53

F– Intoxication aiguë par le 8061 HC chez le Lapin non anesthésié 55
G– Rapports entre toxicité et pouvoir anticholinestérasique *in vivo* 57
H– Essais de réendormissement par le 7900 HC après sommeil par l'Hexobarbital 59

Troisième Partie: Préparation neuromusculaire

Chapitre I: Notions générales sur la transmission neuromusculaire et sur l'action des anticholinestérasiques au niveau de la jonction myoneurale 62
I– Transmission neuromusculaire 63
II– Répartition des cholinestérases musculaires 69
III– Action des anticholinestérasiques à la jonction neuromusculaire 71
1) action par inhibition des cholinestérases 72
2) action par un mécanisme autre que celui de l'inhibition des cholinestérases 79

Chapitre II: Méthodes expérimentales 81
I– Montages neuromusculaires *in situ* 82
II– Montage neuromusculaire *in vitro* préparation nerf phrénique – muscle diaphragme isolés de Rat 95
III– Discussion de l'emploi de l'éthanol comme solvant 95

Chapitre III: Résultats expérimentaux 97
I– Action propre à basse fréquence de stimulation 99
II– Action propre à haute fréquence de stimulation 120
III– Antagonisme *d*-tubocurarine – anticholinestérasiques 125
IV: Antagonisme ou potentialisation vis-à-vis de la succinyldicholine 130
V: Action du méthylsulfate de Pralidoxime 132
VI: Tentative de recherche du lieu et du mécanisme d'action 138

Quatrième Partie: Système nerveux autonome 145
Chapitre I: Action des anticholinestérasiques sur les glandes salivaires 147
I– Généralités 148
II– Méthode expérimentale 149
III– Résultats expérimentaux 150
Chapitre II: Action des anticholinestérasiques sur le système cardiovasculaire 153
I– Généralités 154
II– Méthodes expérimentales 155
III– Résultats expérimentaux 157
Chapitre III: Action des anticholinestérasiques sur les muscles lisses: Intestin 169
I– Généralités 170
II– Méthodes expérimentales 171
III– Résultats expérimentaux 173
IV– Essai d'interprétation des résultats 179

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 181

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 190